

**Pedro André Ferreira  
Campos Lopes**

**GINGIPAINS COMO FACTORES DE  
VIRULÊNCIA NA CAVIDADE ORAL**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Microbiologia, realizada sob a orientação científica da Professora Doutora Maria José Correia, Professora Auxiliar do Departamento de Ciências da Saúde da Universidade Católica Portuguesa e com co-orientação do Professor Doutor António Correia, Professor Catedrático do Departamento de Biologia Universidade de Aveiro.

## **O Júri**

|               |  |
|---------------|--|
| Presidente    | Prof. Doutora Sónia Alexandra Leite Velho Mendo Barroso<br>Professora auxiliar do DBUA   |
| Orientador    | Prof. Doutora Maria José Serol de Brito Correia<br>Professora auxiliar da Universidade Católica Portuguesa,<br>Centro Regional das Beiras; Viseu         |
| Co-orientador | Prof. Doutor António Carlos Matias Correia<br>Professor Catedrático do DBUA  |
| Arguente      | Prof. Doutora Marlene Maria Tourais de Barros<br>Prof. Associada com Agregação da Universidade Católica Portuguesa,<br>Centro Regional das Beiras; Viseu |

## Palavras-chave

*Porphyromonas gingivalis*, proteases, Gingipains, Periodontite, ligamento periodontal, elastases

## Resumo

*Porphyromonas gingivalis*, uma bactéria anaeróbia Gram negativa, é um importante agente etiológico da doença periodontal, sendo encontrada em bolsas periodontais que apresentam doença activa.

A actividade proteolítica desencadeada por este microrganismo desempenha um papel chave na sua patogenicidade. *P. gingivalis* secreta um elevado número de proteases de cisteína como a periodontain, PrtT e gingipains (R1, R2 e K).

Utilizando a informação disponível sobre estrutura e função de proteínas nas bases de dados internacionais (UniProtKB, Merops Database) e informação bibliográfica, caracterizam-se estrutural e funcionalmente as gingipains. Essa informação foi utilizada para esclarecer a nível molecular as interacções descritas entre gingipains e algumas moléculas do hospedeiro. Salientam-se o esclarecimento de possíveis locais de corte das gingipains em inibidores naturais das elastases, identificação molecular de um local de corte na proMMP 1 e 3 e consequente activação desta molécula e a previsão da degradação do inibidor de elastases alfa1antitripsina pela interpain A, uma protease de cisteína de *Prevotella intermedia* com elevada homologia estrutural com as proteases de cisteína PrtT e periodontain de *P. gingivalis*.

Com a integração da informação obtida, sugere-se um possível mecanismo molecular da sinergia criada entre proteínases de cisteína no sentido de promover a doença periodontal.

**Keywords**

*Porphyromonas gingivalis*, proteases, gingipains, Periodontitis, periodontal ligament, elastases

**Abstract**

*Porphyromonas gingivalis*, a Gram negative anaerobe is considered an etiological agent of periodontal disease and is frequently found in periodontal pockets with the active disease. The proteolytic activity associated with this bacteria is considered a key virulence factor. *P. gingivalis* secretes several cysteine proteases such as periodontain, PrtT and the gingipains (R1, R2 e K). Using the available information on protein structure and function available in international databases such as UniProtKB, Merops Database and bibliographic references, the gingipains were characterized in terms of structure and function. The information obtained was used to clarify the molecular interactions already described between gingipains and host molecules. Possible cleavage sites were identified in host produced elastase inhibitors and in pro-MMP3. The suggestion that the elastase inhibitor alpha1-antitrypsin is also degraded by interpain A is also made. Interpain A is a cysteine protease of *Prevotella intermedia* sharing a high homology with the PrtT and periodontain of *P. gingivalis*. The integration of the information obtained suggests a synergistic molecular mechanism by which cysteine proteases can be responsible for clinical manifestations of periodontal disease.

# Índice

|               |  |           |
|---------------|--|-----------|
| <b>1</b>      | <b>-Introdução.....</b>  | <b>8</b>  |
| 1.1           | Periodonto saudável.....   | 10        |
| 1.2           | Doença Periodontal.....  | 11        |
| 1.3           | Microbiota associada à periodontite.....                                     | 13        |
| 1.3.1         | Conceitos Gerais.....  | 13        |
| 1.3.2         | Ecossistema periodontal.....   | 15        |
| 1.3.2.1       | <i>Porphyromonas gingivalis</i> .....  | 18        |
| 1.3.2.1.1     | Proteases produzidas por <i>P. gingivalis</i> .....                          | 19        |
| 1.3.2.1.1     | Periodontain.....  | 20        |
| 1.3.2.1.2     | PrT.....   | 21        |
| 1.3.2.1.3     | Gingipains.....  | 22        |
| 1.3.2.1.1.1   | Os genes das gingipains.....   | 23        |
| 1.3.2.1.1.2   | Produção e maturação das gingipains.....                                     | 26        |
| 1.3.2.1.1.3   | Estrutura das gingipains.....  | 27        |
| 1.3.2.1.1.4   | Características funcionais.....  | 28        |
| 1.3.2.1.1.5   | Gingipains e virulência.....   | 29        |
| 1.3.2.1.1.5.1 | <b>Adesão/invasão</b> .....  | 29        |
| 1.3.2.1.1.5.2 | <b>Aumento da permeabilidade vascular</b> .....                              | 30        |
| 1.3.2.1.1.5.3 | <b>Actuação sobre os mecanismos de defesa do hospedeiro</b> .....            | 31        |
| 1.3.2.1.1.5.4 | <b>Degradação de proteínas da matriz extracelular...</b>                     | 34        |
| 1.3.2.1.1.5.5 | <b>Envolvimento na reabsorção óssea</b> .....                                | 33        |
| 1.4           | Objectivos da tese.....  | 36        |
| <b>2</b>      | <b>- Material e Métodos.....</b>   | <b>37</b> |
| 2.1           | Caracterização das gingipains.....   | 37        |
| 2.1.1         | Sequências homólogas.....  | 37        |
| 2.1.2         | Domínios funcionais.....   | 37        |
| 2.1.3         | Modelos.....   | 38        |
| 2.1.4         | Outros dados.....  | 38        |
| 2.2           | Caracterização das moléculas do hospedeiro.....                              | 38        |
| 2.3           | Caracterização da PrT e periodontain.....                                    | 38        |
| <b>3</b>      | <b>-Resultados e Discussão.....</b>  | <b>40</b> |
| 3.1           | Caracterização das gingipains.....   | 40        |
| 3.1.1         | Domínios funcionais das gingipains.....                                      | 43        |
| 3.2           | Actividade proteolítica das gingipains.....                                  | 44        |
| 3.2.1         | Actuação sobre inibidores de elastase.....                                   | 44        |
| 3.2.1.1       | SLPI.....  | 45        |
| 3.2.1.2       | Elafina:.....  | 49        |
| 3.2.2         | Razões estruturais para a activação de metaloproteinases por gingipains..... | 52        |
| 3.2.3         | Outras moléculas envolvidas nos sinais clínicos da Periodontite.....         | 58        |
| 3.2.3.1       | Osteoprotegerina.....  | 58        |
| 3.2.3.2       | TNF-alfa.....  | 61        |

|  |           |
|--|-----------|
| 3.2.3.3 Protrombina.....   | 63        |
| 3.3 Modelos tridimensionais das proteases PrtT e periodontain..... | 66        |
| <b>4- Conclusões.....</b>  | <b>70</b> |
| <b>Bibliografia.....</b>   | <b>74</b> |
| <b>Anexo I.....</b>  | <b>80</b> |
| 1. Alinhamento das várias sequências de gingipains.....            | 80        |
| 2. Alinhamento periodontain, PrtT, streptopain, interpain.....     | 89        |
| <b>Anexo II – Domínios funcionais das 3 gingipains.....</b>        | <b>91</b> |

## **1 -Introdução**

O termo “Doença Periodontal” é utilizado para designar, genericamente, um conjunto de manifestações patológicas que afectam as estruturas de suporte dos dentes e que compreendem, numa perspectiva clínica, essencialmente duas formas de apresentação: a gengivite e a periodontite. A gengivite, a mais frequente destas patologias, é um processo inflamatório reversível, que se manifesta como uma inflamação da gengiva marginal, induzida fundamentalmente pela acumulação de placa bacteriana (Newman, Takei, & Carranza, 2004). A Periodontite compreende um conjunto de condições inflamatórias dos tecidos de suporte do dente, resultantes da infecção causada por microrganismos (Newman, Takei, & Carranza, 2004), que leva a uma destruição progressiva do periodonto, e à formação de bolsas periodontais e/ou recessões gengivais, perda do osso de suporte e, em último caso, à perda dentária. Clinicamente, observam-se ainda perdas horizontais e verticais do osso alveolar, alterações na cor, contorno, forma, posição, consistência e contorno da gengiva, surgindo frequentemente hemorragia à sondagem (Newman, Takei, & Carranza, 2004).

A nível mundial, estima-se que 90% da população seja afectada pela Doença Periodontal, embora só 10% apresente periodontite (Pihlstrom *et al*, 2005). No entanto, enquanto a gengivite é relativamente comum em todas as idades, a periodontite afecta principalmente adultos e idosos, quando estes se apresentam expostos a certos factores de risco durante um período prolongado, como o tabaco, e doenças sistémicas como a diabetes, não sendo possível conservar uma dentição funcional (Nunn, *et al*, 2003). Esta perda leva a uma redução significativa da qualidade de vida, não só pelas dificuldades mastigatórias como também pela questão estética e da auto-estima (Newman, Takei, & Carranza, 2004).

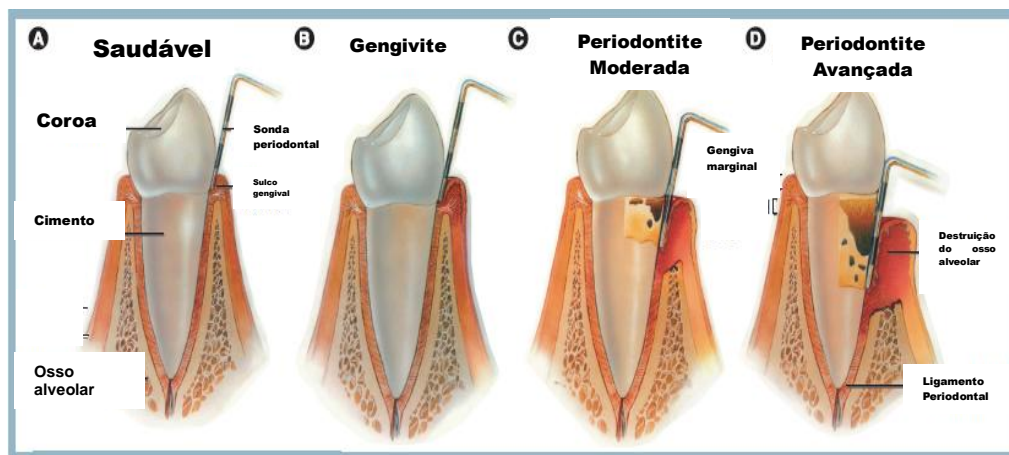


Figura 1- Progressão da doença periodontal. (A) Representa uma situação normal, com gengiva aderida, coloração rosa-coral e profundidade de sondagem inferior a 3mm. (B) Existe já gingivite, caracterizada pelo edema e eritema das gengivas e fundamentalmente hemorragia à sondagem, causada pela acumulação de placa bacteriana. (C) Periodontite moderada, caracterizada pela presença de tártaro, destruição do osso alveolar e aumento da profundidade à sondagem (> 3mm). (D) Periodontite avançada, existe uma inflamação severa, grande destruição do osso alveolar, recessões gengivais e profundidade à sondagem superior a 5 mm. O dente apresenta já mobilidade. (Adaptado de Fitzpatrick, Wijeyewickrema&Pike, 2009)

O conceito etiopatogénico actual de doença periodontal defende que a presença de bactérias é um factor primário ou essencial para a ocorrência da doença mas, quando considerada isoladamente, essa presença não basta, para determinar o início ou a gravidade da periodontite. É claramente reconhecida a necessidade de outros factores determinantes da susceptibilidade do hospedeiro como a diabetes e as suas complicações sistémicas (Grossi *et al*, 1994; Bergstrom, Eliasson & Dock, 2000), forças oclusais excessivas (Harrel *et al*, 2001; Nunn *et al*, 2001), infecção por HIV (Robinson *et al*, 2000) e osteoporose (Geurs *et al*, 2003; Bergstrom, Eliasson & Dock, 2000), os quais contribuem, de forma importante, para a expressão clínica das alterações patológicas do periodonto (Page *et al*, 1997; Newman, Takei, & Carranza, 2004). No entanto, há microrganismos que surgem mais frequentemente nas bolsas periodontais com doença activa e, por isso, foram identificados como agentes etiológicos (Socransky *et al*, 1998). Entre estes microrganismos encontram-se *Porphyromonas gingivalis*, *Agreggatibacter actinomycetemcomitans* e *Prevotella intermédia* (Socransky *et al*, 1998). Os microrganismos citados têm sido bastante estudados do ponto de vista da sua fisiologia e dos factores de virulência (Fitzpatrick, Wijeyewickrema & Pike, 2009). Desses estudos ressaltam a importância das peptidases na virulência de *P. gingivalis*, bem como a importância das sinergias



estabelecidas entre os vários microrganismos.

O objectivo desta tese é usar a informação da bioquímica estrutural, bibliográfica e ferramentas bioinformáticas, para sugerir um modelo teórico de interacção de três proteases bacterianas com moléculas do hospedeiro envolvidas na etiopatogenia da periodontite.

## **1.1 Periodonto saudável**

O periodonto (peri = à volta, odonto = dente) é uma estrutura complexa, formada por tecidos de revestimento e suporte do dente: gengiva, ligamento periodontal, cimento radicular e o osso alveolar. A gengiva tem como principal função proteger os tecidos subjacentes que ligam o dente ao osso alveolar. O ligamento periodontal tem um importante papel no suporte do dente durante actos fisiológicos, como na mastigação e na resistência a forças externas (Lindhe, 2005).

O cimento radicular é um tecido mineralizado, fundamentalmente hidroxiapatite (65%), que recobre a raiz do dente. É também formado por fibras de colagénio embebidas numa matriz orgânica, que se inserem profundamente no cimento, numa posição perpendicular à raiz do dente, contribuindo para a ligação do dente ao osso. Não apresenta inervação ou irrigação e é caracterizado por um depósito contínuo durante a vida (Lindhe, 2005).

O osso alveolar é definido como a parte do maxilar/mandíbula que forma os processos alveolares, que suportam os dentes. Estes alvéolos são constituídos por células do folículo dentário e outras células (osteoblastos) independentes do desenvolvimento dentário. O osso alveolar, juntamente com o cimento radicular, constitui o sistema de suporte do dente, tendo como principal função distribuir e reabsorver as forças criadas pela mastigação, por exemplo (Lindhe, 2005).

Um ligamento periodontal saudável, consiste em fibras de colagénio tipo I, III e IV envolvidas por proteínas de origem não-colagénica como fibras oxitalânicas, fibras de elastina, reticulina, proteoglicanos e glicoproteínas com uma função fundamentalmente de protecção contra as elastases produzidas pelos neutrófilos

(EPN) (Houle *et al*, 2003; Ujiie *et al*, 2007).

As fibras de colagénio, o principal constituinte do ligamento periodontal, inserem-se no osso alveolar e no cimento radicular e são responsáveis pela manutenção da força mecânica do ligamento e a sua destruição acelera a progressão da doença periodontal. As fibras oxitalânicas correm paralelamente ao longo eixo do dente e inserem-se no osso alveolar e, em alguns casos, no cimento radicular, o que sugere uma possível função relacionada com a resistência mecânica pela ancoragem conseguida. Estas fibras suportam ainda os vasos sanguíneos e linfáticos do ligamento periodontal (Ujiie *et al*, 2008).

Outros constituintes do ligamento incluem fibroblastos, cimentoblastos, osteoblastos, osteoclastos, células do sistema imunitário como macrófagos, mastócitos e eosinófilos, vasos linfáticos e terminações nervosas (Lindhe, 2005).

## **1.2 Doença Periodontal**

O periodonto é uma estrutura complexa e dinâmica sujeita a um controlo rigoroso do ciclo de degradação / regeneração. A alteração deste equilíbrio, por exemplo devido à resposta inflamatória desencadeada pela acumulação de bactérias na superfície dos dentes, resulta num aumento da degradação do tecido conjuntivo, perdendo-se o equilíbrio e conduzindo à gengivite e à periodontite (Potempa, 2000).

É actualmente aceite que a periodontite é o resultado de alterações no controlo da proteólise, em que a degradação das fibras de colagénio do ligamento periodontal e a reabsorção do osso alveolar são os sinais clínicos mais evidentes (Potempa, 2000). Em condições fisiológicas, a actividade proteolítica é rigorosamente controlada de várias formas, quer pela regulação da expressão de genes que codificam as proteases, quer pela produção de inibidores endógenos para essas proteases, ou ainda pela manutenção das proteases sob formas moleculares não activas (zimogénios).

Na doença periodontal, as bactérias que aderem à superfície dos dentes, formam o biofilme oral e consituem um inóculo das áreas adjacentes como o sulco gengival (Marsh, 2003). A interacção de bactérias com as células epiteliais do

ambiente subgengival, promove a destruição dos tecidos do hospedeiro. Anatomicamente, quando uma superfície dentária saudável é colonizada por bactérias, estas inicialmente aderem à sua superfície e só depois colonizam o ambiente subgengival (o sulco gengival), que numa situação normal tem uma profundidade de até 3 mm (Holt & Ebersole, 2005). Este sulco está permanentemente exposto aos fluídos orais e apresenta uma boa disponibilidade de nutrientes o que favorecerá o desenvolvimento de microrganismos (Lang *et al*, 2005). Na base deste sulco, o epitélio gengival forma um epitélio juncional directamente ligado ao dente. Este epitélio juncional não é queratinizado e é pouco diferenciado sendo por isso susceptível à invasão por microrganismos como a *P. gingivalis* e outros membros deste nicho ecológico (Holt & Ebersole, 2005). Estas células epiteliais encontram-se, portanto, directamente expostas à acção dos microrganismos e dos seus produtos metabólicos.

As interacções que ocorrem entre as bactérias, os seus produtos metabólicos e as células epiteliais ao nível dos receptores expressos nas suas membranas, desencadeiam processos de sinalização molecular que modulam a resposta inflamatória, contribuindo assim, para a instalação e progressão da doença (Lourbakos *et al*, 2001). Quando a resposta inflamatória está instalada (Figura 1), a profundidade do sulco gengival aumenta na direcção da raiz do dente, convertendo-se numa bolsa periodontal ( $\geq 3$ mm de sondagem). O início da formação da bolsa periodontal está associado a alterações tecidulares que modificam a estrutura do epitélio juncional. Estas alterações tecidulares resultam de factores patogénicos cujos mecanismos de sinalização extra e intra celular não estão totalmente esclarecidos (Lang *et al*, 2005).

Do ponto de vista estrutural, o que se observa numa fase inicial da doença periodontal, é a ausência das proteínas que recobrem as fibras de colagénio do ligamento periodontal que estiveram sujeitas à acção das elastases e outras proteases bacterianas, afectando de imediato a resistência mecânica do ligamento. As fibras de colagénio ficam assim mais expostas à acção das collagenases, contribuindo para a degradação do ligamento e progressão da doença periodontal (Ujije, *et al* 2007).

O fluído crevicular, outro componente do periodonto, preenche o sulco gengival

e consiste num exsudato sanguíneo que atravessa as junções intercelulares do epitélio juncional (Lang *et al*, 2005). Apresenta, por isso substâncias originárias do hospedeiro, como proteínas do plasma, células imunitárias infiltradas nos tecidos periodontais, citocinas e interleucinas (IL), e enzimas como as elastases produzidas pelos neutrófilos, metaloproteinases e catepsinas B, G, H e L, cuja acção foi co-relacionada com a destruição *in vivo* dos tecidos periodontais.

Existem evidências de que há enzimas de origem microbiana envolvidas na activação e inibição de algumas das moléculas produzidas pelo hospedeiro e que podem intervir na sinalização celular (Potempa *et al*, 2000, Buchmann *et al*, 2002; Marsh, 2003; Ujiie *et al*, 2007; Lamster *et al*, 2007). Finalmente é de salientar a presença de inibidores de proteases como a alfa 2 macroglobulina e a alfa 1 antiproteínase, cujo papel será moderar a proteólise descontrolada dos tecidos periodontais (Potempa, 2000).

O volume de fluído crevicular num determinado local, pode ser directamente relacionado com o grau de inflamação do tecido periodontal, já que locais com um aumento do volume deste fluído estão associados a um processo inflamatório moderado a severo (Lang *et al*, 2005; Lamster *et al*, 2007). Nos casos em que há aumento do volume do fluído crevicular, estão normalmente presentes as IL-6, IL-8, IL-1beta, Factor de Necrose Tumoral (TNF) alfa e a prostaglandina E2 (Lourbakos *et al*, 2001). A IL-6 está descrita com indutora da formação de osteoclastos, que promovem a reabsorção óssea, contribuindo para a evolução da doença periodontal (Lourbakos *et al*, 2001).

### **1.3 Microbiota associada à periodontite**

#### **1.3.1 Conceitos Gerais**

Em meados do século XX, acreditava-se que a periodontite era uma doença que se desenvolvia com o avançar da idade e era provocada pela acumulação de placa bacteriana em torno dos dentes, devido à falta de hábitos de higiene oral. Os microrganismos da placa eram vistos como tendo todos o mesmo potencial patogénico, sendo por isso, igualmente capazes de provocar a periodontite. Marsh (2003) considera que este estado do conhecimento sobre a etiologia da patologia corresponde à *Teoria da placa não específica*. No entanto, observações

clínicas associadas a estudos microbiológicos revelaram posteriormente, que certos indivíduos que tinham uma considerável acumulação de placa e tártaro (placa bacteriana mineralizada), não desenvolviam periodontite. Estas observações, juntamente com o evoluir das técnicas de cultura e identificação bacteriana a nível molecular, levaram à proposta por Loesche (1976) da *Teoria da placa específica*. Com esta teoria, era proposto que apesar de estarem presentes na placa bacteriana diversas espécies, apenas um número limitado e específico de bactérias estavam directamente envolvidos na doença. Assim, a diferença entre saúde e doença periodontal residia na presença e na quantidade de espécies bacterianas específicas, principalmente *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* e *Treponema denticola*. A quantidade de microrganismos presentes, estabelecia os diversos níveis da doença periodontal, ou seja, para ocorrer periodontite era necessário um maior número de bactérias específicas do que para ocorrer a gengivite (Haake *et al*, 2006). Mais tarde, descobriu-se que estas bactérias consideradas específicas e determinantes para o aparecimento da doença, estavam presentes em locais saudáveis, sem sinais de inflamação (Haake *et al*, 2006). Este facto levou ao aparecimento da *Teoria ecológica*, que defende que a flora normal sofre localmente uma transição de comensal para patogénica, devido a uma alteração na proporção das espécies presentes, causada por factores ambientais, como alterações no pH do meio. Esta teoria mantém o conceito de que há espécies bacterianas com diferentes potenciais patogénicos, e que as alterações ambientais provocarão alterações na expressão génica destas, o que resulta numa selecção das espécies mais adaptadas (Marsh, 2003).

Assim, factores do hospedeiro e factores do ambiente oral desempenham um papel etiológico relevante ao influenciar a gravidade da doença periodontal e a resposta ao tratamento. O que distingue a teoria ecológica das anteriores é o facto de que a patologia oral pode ser prevenida não só controlando directamente os microrganismos através de agentes antimicrobianos ou antisépticos, mas também interferindo com factores locais que dificultem a transição da flora comensal para patogénica (Marsh, 2003).

### 1.3.2 Ecossistema periodontal

A cavidade oral é constantemente banhada pela saliva, que mantém a temperatura entre os 35-36°C e estabelece um pH de 6,75-7,25, o que favorece o crescimento de muitos microrganismos (Marsh, 2003).

A complexidade do microbiota subgengival há muito que é reconhecida, desde as observações de amostras desta placa por Van Leeuwenhoek, em 1683 (Socransky et al, 1998). É, no entanto, aceite que o despoletar da periodontite, resulta da presença de um complexo conjunto microbiano, derivado das cerca de 700 espécies que potencialmente colonizam o sulco gengival. A acumulação dos microrganismos é facilitada pelas mudanças estruturais do sulco gengival que progressivamente se transforma em bolsa periodontal (Holt & Ebersole, 2005).

Uma vez que se pensa que, cerca de 50% da microflora presente nas bolsas seja ainda não cultivável (Marsh, 2003), Socransky e o seu grupo de investigação têm estudado a microflora das bolsas periodontais conjugando as técnicas tradicionais baseadas em cultura com técnicas moleculares (de forma a incluir os microrganismos não cultiváveis) e do trabalho desta equipa resultou uma catalogação e divisão do microbiota oral em complexos, de acordo com as espécies que são encontradas em conjunto em amostras de placa subgengival e a sua associação com a doença periodontal.

O complexo amarelo inclui espécies de *Streptococcus* que são encontradas em conjunto nas amostras de placa subgengival como *S. oralis*, *S. sanguinis*, *S. mitis*, *S. intermedius* e *S. gordonii* e do complexo roxo fazem parte *Actinomyces odontolyticus* e *Veillonella parvula*. As bactérias do complexo amarelo e *Actinomyces* do complexo roxo são considerados colonizadores primários das superfícies dentárias, pela possível expressão de receptores para ligandos do hospedeiro, o que lhes permitirá uma rápida e firme adesão nas fases iniciais do biofilme oral.

O complexo verde é constituído por microrganismos como *Capnocytophaga* spp, *Campylobacter concisus*, *Eikenella corrodens* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* que são detectados juntos em amostras de placa subgengival (Holt & Ebersole 2005). O complexo laranja inclui diversos microrganismos com um potencial patogénico significativo entre os quais *Prevotella intermedia*,

*Fusobacterium nucleatum* e *F. periodonticum*, *Micromonas micros*, *Campylobacter* spp, *Eubacterium* spp e *Streptococcus constellatus* (Socransky *et al*, 1998; Holt & Ebersole, 2005). As espécies deste complexo apresentam características que lhes permitem usar e disponibilizar nutrientes no biofilme e ainda expressam, à superfície da célula, estruturas que possibilitam a ligação com os colonizadores primários e membros do complexo vermelho. *M. micros* e *Campylobacter rectus* estão muitas vezes associados a amostras de placa subgengival de dentes com mobilidade evidente (Socransky *et al*, 1998). O complexo vermelho, o que apresenta maior patogenicidade potencial e surge numa fase mais tardia, inclui as espécies que são encontradas juntas em locais com lesões mais avançadas e por isso, mais associadas à periodontite, *P. gingivalis*, *Tannerella forsythia* e *Treponema denticola* (Socransky *et al*, 1998; Ximénez-Fyvie LA *et al*, 2000; Holt & Ebersole, 2005). *T. denticola* e *P. gingivalis* estão associados a bolsas periodontais com profundidade superior a 4 mm, estando *T. denticola* na zona superficial da placa e *P. gingivalis* nas zonas mais próximas do “fundo” da bolsa, e ainda ao sangramento à sondagem clínica (Socransky *et al*, 1998; Fitzpatrick, Wijeyewickrema&Pike, 2009). Estes microrganismos apresentam diversas características que os relacionam com a destruição do peridonto, já que surgem quando aparecem sinais clínicos dessa destruição e estudos *in vitro* revelam a sua capacidade de expressão de proteases associadas à membrana celular, como as gingipains de *P. gingivalis* (Holt & Ebersole, 2005).

É importante salientar que nenhuma espécie, por si só, é o agente etiológico da periodontite e que as espécies bacterianas, na cavidade oral, se agrupam em complexos no biofilme e são estes complexos que serão responsáveis pela iniciação do processo patológico (Holt & Ebersole, 2005). O facto de a periodontite ser uma infecção polimicrobiana faz com que ainda não exista um modelo que explique como este microbiota complexo compete, coexiste ou actua em conjunto, sinergicamente (Holt & Ebersole, 2005; Polak *et al*, 2009).

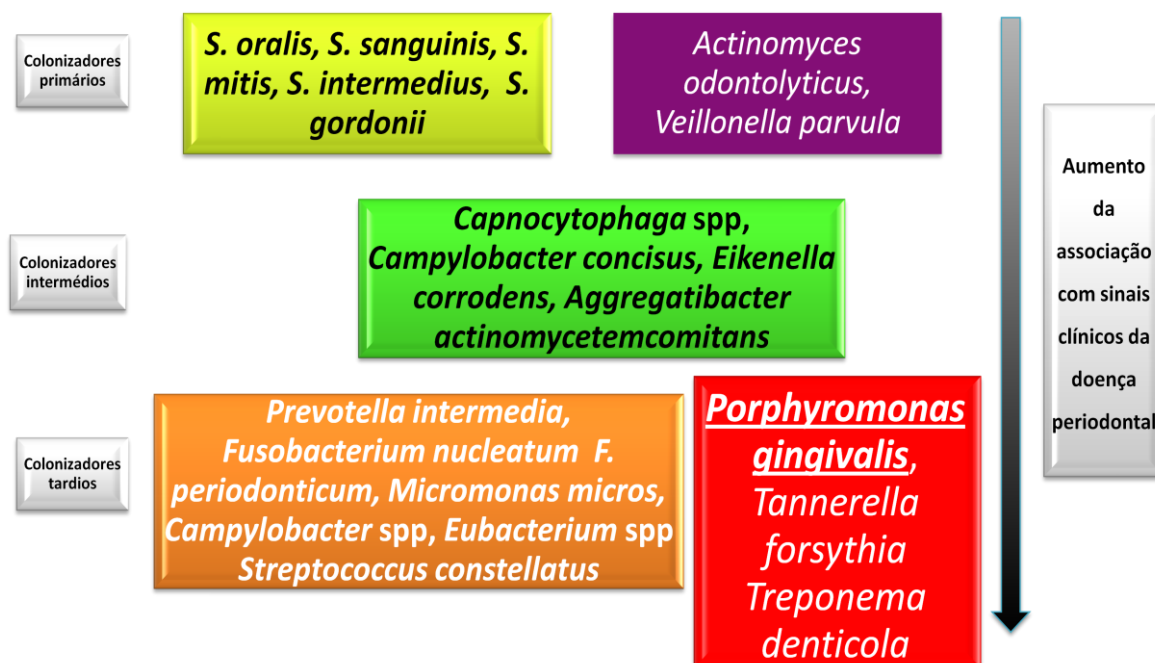


Figura 2 – Diagrama representativo das espécies microbianas que constituem os complexos microbianos da flora subgengival. Baseado em Holt & Ebersole, 2005.

Apesar de ser cientificamente aceite que a doença periodontal tem como factor etiológico a placa bacteriana, a resposta do sistema imunitário desempenha um papel essencial na destruição dos tecidos periodontais. São atraídas e recrutadas para o local da infecção, células do hospedeiro como neutrófilos, que se agregam e libertam moléculas com o objectivo de eliminar as células microbianas. Esta resposta inicial à inflamação pode levar à produção em grandes quantidades de factores pró-inflamatórios que promovem a progressão da doença periodontal ao contribuírem para a proteólise e lesão dos tecidos e osso de suporte (Buchmann *et al*, 2002). A complexa interacção entre os factores de virulência dos microrganismos e os efectores da resposta inflamatória do hospedeiro resultam numa inflamação localizada crónica com consequente perda das estruturas de suporte do dente que pode levar à perda dentária (Potempa *et al*, 2003).

Muitos dos tratamentos actuais para a periodontite são baseados na *Teoria não específica da placa* e consistem na redução dos níveis de placa bacteriana, para prevenir ou impedir a progressão da doença. Com a hipótese ecológica, pretende-se que os tratamentos passem, não só pela eliminação da placa, mas também pela modulação da composição microbiana do biofilme e da resposta do hospedeiro à presença dos microrganismos no epitélio peridontal (Haake *et al*, 2006).



### 1.3.2.1 *Porphyromonas gingivalis*

*P. gingivalis* tem sido identificada como um dos principais agentes etiológicos na periodontite (Holt *et al*, 1988; Kuramitsu, Yoneda & Madden, 1995; Potempa *et al*, 1998, Loubakos *et al*, 2001, O'Brien-Simpson *et al*, 2001, Into *et al*, 2006, Nguyen *et al*, 2007), fundamentalmente pela detecção de anticorpos anti-*P.gingivalis* em indivíduos com periodontite (Haake *et al*, 2006). Esta bactéria está presente em locais sem doença activa (Katz *et al*, 2002), estando em número elevado em bolsas periodontais com lesões avançadas e muito frequentemente associada a *Tannerella forsythia* (Socransky *et al*, 1998, Holt & Ebersole, 2005).

*P. gingivalis* é uma bactéria Gram negativa, anaeróbia, imóvel e com forma de bastão. (Holt & Ebersole, 2005; Ylmaz, 2008). Adere a várias superfícies da cavidade oral como a mucosa oral, a língua, o palato, o esmalte, a placa dentária supragengival e está presente fundamentalmente no ambiente subgengival (Curtis *et al*, 2001; Guentsch *et al*, 2007, Hasegawa *et al*, 2008).

Para além de outros factores de virulência como fímbrias, cápsula, hemaglutininas, hemolisinas e superoxidodismutase, esta bactéria secreta uma grande variedade de proteases de cisteína como a periodontain, PrtT e principalmente as gingipains (Kuramitsu, Yoneda & Madden, 1995; Amano, A., 2003; Into *et al*, 2007; Sheets *et al*, 2008).

Vários estudos têm sido feitos para avaliar a influência do ambiente na regulação da expressão das gingipains. Estudos de McDermid (1988) e Marsh (2004) sugeriram que a expressão de proteases é regulada por factores ambientais como os níveis de hemina no meio de cultura, obtendo-se os níveis de proteases mais elevados com grandes quantidades de hemina. Smalley *et al* (1996) verificaram ainda que as estirpes de *P.gingivalis* com receptores de hemina à superfície da célula eram mais virulentas e pigmentadas. Por outro lado, Carman *et al* (1990) mostram que a quantidade de hemina no meio de cultura determina também a quantidade de receptores expressos à superfície de *P.gingivalis* ainda que a hemina como factor nutritivo não pareça ter o mesmo efeito em todas as estirpes.

Outro factor ambiental que também afecta a expressão destas proteases é a temperatura. Percival *et al* (1999), sugeriram que o aumento da temperatura de

37 para 41°C teria pouco impacto no crescimento das células bacterianas, mas que causava uma redução significativa na actividade das gingipains R e K, de respectivamente 82 e 73%. Estes dados sugerem que a temperaturas mais elevadas nas bolsas periodontais, *P. gingivalis* adoptará um fenótipo menos agressivo.

#### **1.3.2.1.1 Proteases produzidas por *P. gingivalis***

A actividade proteolítica de *Porphyromonas gingivalis* desempenha um papel chave na sua patogenicidade, permitindo a invasão e destruição dos tecidos (Sheets *et al*, 2006, 2008); invasão e destruição de células do hospedeiro (Sheets *et al*, 2008), escape a alguns mecanismos de defesa imunitária humana (Sheets *et al*, 2008) e modulação da resposta inflamatória (Fitzpatrick, Wijeyewickrema & Pike, 2009). Por outro lado, as proteases produzidas por *P. gingivalis* desempenham um papel importante na nutrição desta bactéria assacarolítica, que ao não utilizar hidratos de carbono para produzir energia, obtem-na através da degradação de proteínas e aminoácidos do hospedeiro (Fitzpatrick, Wijeyewickrema & Pike, 2009).

Nas bolsas periodontais colonizadas por *P. gingivalis* existe uma grande variedade de proteases produzidas pelo hospedeiro (elastases produzidas por neutrófilos e metaloproteinases derivadas de células do sistema imunitário e dos fibroblastos), que interagem com proteases produzidas por microrganismos presentes na placa subgingival (Curtis *et al*, 2001). Além disso, Umemoto *et al* (1999) sugerem que as gingipains de *P. gingivalis* podem modelar a coadesão com *Treponema medium*. Esta sugestão é feita pelo facto de a coadesão entre uma proteína membrana de *Treponema medium* de 37kDa e a FimA de *P. gingivalis* ser inibida, entre outros factores, pela arginina e lisina. Este efeito das gingipains na coadesão pode ser justificado de forma indirecta, uma vez que se conhece que as gingipains participam no processamento da FimA, e portanto não havendo formação de FimA estarão afectados muitos factores de reconhecimento e adesão (Umemoto *et al*, 1999).

### **1.3.2.1.1 Periodontain**

A periodontain é uma protease de cisteína que foi isolada pela primeira vez do sobrenadante de uma cultura de *P. gingivalis* (HG66) (Nelson *et al*, 1999). Consiste num dímero de 75KDa, em que o local activo está na cadeia pesada (55KDa) (Holt & Ebersole, 2005), e que partilha grande homologia com a streptopain (protease produzida por *Streptococcus pyogenes*), com a PrtT (outra protease *P. gingivalis*) e a interpain A (protease de *Prevotella intermedia*). Por apresentar semelhanças estruturais e funcionais com estas, foi inserida no Clan CA, família C10 (Potempa *et al*, 2000; Curtis *et al*, 2001, Rawlings, 2008). A periodontain é expressa por várias estirpes de *P. gingivalis*, e encontra-se em vesículas ou na forma solúvel na estirpe HG66 ou associada à célula nas estirpes ATCC 33277, W50, W12 e 381 (Curtis *et al*, 2001).

Esta protease necessita de agentes redutores como a cisteína para a sua actividade catalítica e ao contrário das gingipains, o cálcio não contribui para a sua estabilidade (Curtis *et al*, 2001). Mantêm-se estável com pH entre os 7.5-8.0 e a temperatura ideal para a sua actividade ronda os 37°C. A sua acção é limitada por inibidores comuns das proteases de cisteína como a leupeptina, iodoacetamida e E-64 (Curtis *et al*, 2001).

Esta protease não degrada colagénio, fibrinogénio ou fibrina. No entanto, polipéptidos ou grandes proteínas desnaturadas são facilmente clivadas, sendo característica uma proteólise não específica dos seus substratos (Nelson *et al*, 1999; Potempa *et al*, 2000; Holt & Ebersole, 2005). Foi demonstrado que a periodontain inactiva serpinas do plasma tais como a alfa1antiproteinase (Nelson *et al*, 1999), uma das moléculas envolvidas no controle da actividade proteolítica do hospedeiro (Holt & Ebersole, 2005). Assim, a acção desta protease de *P. gingivalis* diminuirá a inibição das elastases produzidas pelo hospedeiro, o que contribui (juntamente com a acção proteolítica directa das gingipains) para a destruição do ligamento periodontal (Potempa *et al*, 2000; Potempa *et al*, 2005).

Além do efeito sinérgico da periodontain e gingipains na destruição do periodonto, as gingipains parecem estar envolvidas no processamento e activação da periodontain, já que esta é activada proteoliticamente pelo corte no

resíduo Arg 147-Thr, seguido pelo corte no resíduo Lys 629 do C-terminal, gerando assim a cadeia leve da periodontain na forma activa (Potempa *et al*, 2000) (Figura 3) .



Figura 3 - Representação esquemática do processamento e activação da periodontain. As setas vermelhas indicam o local de corte pelas gingipains R (Arg-147) e pela gingipain K (Lys- 629) (Adaptado de Potempa *et al*, 2000)

#### 1.3.2.1.2 *PrtT*

Esta protease resulta da expressão do gene *prtT*, localizado entre o gene relativo à colagenase *prtC* (*prtC*) e do super óxido dismutase (*sod*) (Otogoto & Kuramitsu, 1993; Madden,Clark & Kuramitsu,1995). Esta protease apresenta uma elevada homologia com a periodontain, streptopain e interpain A (Nelson *et al*, 1999), fundamentalmente no que diz respeito ao local activo, estando incluída no clan CA, família C10. Esta semelhança estrutural sugere que estas proteases possam ter actividades biológicas semelhantes.

O C-terminal parece estar relacionado com a sua actividade de hemaglutinação (Madden, Clark & Kuramitsu, 1995).

Da mesma forma que a periodontain, a *PrtT* parece não degradar proteínas (colagénio, lamininas, fibronectina, albumina, e IgG e IgM) na sua forma nativa, degradando-as apenas quando desnaturadas. No entanto, foi verificado que a *PrtT* inactiva a alfa1antiproteínase, por proteólise desta, cortando num resíduo de arginina. A inactivação do inibidor contribuirá para a degradação do periodonto pelas elastases produzidas pelos neutrófilos (Potempa *et al*, 2000).

### 1.3.2.1.3 Gingipains

As gingipains são das proteases produzidas por *P. gingivalis*, as mais estudadas e melhor caracterizadas (Fitzpatrick, Wijeyewickrema & Pike, 2009).

São consideradas proteases de cisteína uma vez que o grupo thiol do resíduo de cisteína do local activo, funciona como nucleófilo, no mecanismo catalítico (Barrett, Rawlings, 1996). Dentro das proteases de cisteína, estão classificadas numa família separada, C25, já que não apresentam homologia da sua sequência de aminoácidos com outras proteases conhecidas (Fitzpatrick, Wijeyewickrema & Pike, 2009). A família C25, que tem como protease tipo a gingipain R2, apresenta o motivo His-Gly-espaçador-Ala-Cys na díade catalítica, e está classificada no clan CD com as famílias C11 (que inclui a clostripain), C13 (que inclui a legumain) e C14 (que inclui a caspase 1).

Desde 1984, quando se iniciou a purificação destas proteases produzidas por *P. gingivalis*, surgiram diversas nomenclaturas devido às diferenças na massa molecular, especificidade e susceptibilidade aos inibidores sintéticos que foram sendo identificadas pelos vários grupos que isolaram e caracterizaram as gingipains. Assim, foram-lhe atribuídos diversos nomes: “ trypsin-like proteases”, devido à sua actividade proteolítica semelhante à da tripsina; proteases específicas para resíduos de arginina e lisina, pela sua especificidade no corte, protease I e II, PrR2, PrR1, gingivain, porphypain, entre outras (Curtis *et al*, 2001). O facto de por vezes as actividades proteolíticas referidas nas publicações derivarem de extractos ou sobrenadantes resultantes de lise celular fez também com que nem sempre se soubesse exactamente a que proteases se deviam os resultados observados. O desenvolvimento de técnicas de mutação dirigida permitiu que nalguns casos fossem inactivados genes responsáveis pela síntese de gingipains e observadas as alterações na virulência de *P.gingivalis* (Aduse-Opoku *et al*, 2000; O'Brien-Simpson *et al*, 2001; Houle *et al*, 2003; Grenier *et al*, 2003). Desta forma foi possível isolar e determinar a sequência de nucleótidos dos genes responsáveis pela síntese das gingipains (revisto por Curtis *et al*, 2001). Destes trabalhos surgiu um conjunto de informação onde por vezes os genes responsáveis pela síntese das mesmas proteases eram denominados e identificados de formas diferentes. Em 2001, Curtis *et al*, publicam uma revisão da denominação dos loci responsáveis

pela síntese de gingipains reconhecendo apenas 3 loci: *rgpA*, *rgpB* e *kgp*.

A sequenciação do genoma de *P. gingivalis* das estirpes W83 (Nelson *et al*, 2003) e ATCC 33277 (Naito *et al*, 2008), veio comprovar que nestas estirpes os loci *rgpA*, *rgpB* e *kgp* aparecem integrados no genoma, embora possam ter designações diferentes dependendo da anotação consultada. Por exemplo, consultando as anotações no site da Human Oral Microbiome Database ([www.homd.org](http://www.homd.org)), no genoma da estirpe ATCC33277 figura a designação de RGP1 e no genoma da estirpe W83 a designação de HagE, sendo que o tamanho da sequência é exactamente o mesmo, tal como as características do péptido produzido.

#### 1.3.2.1.1.1 Os genes das gingipains

As gingipains R são o produto de dois genes distintos mas relacionados o que é evidenciado pela elevada homologia apresentada (Fitzpatrick, Wijeyewickrema & Pike, 2009). Com a clonagem e sequenciação destes genes em diferentes estirpes foram publicados nomes diferentes mas que correspondem essencialmente à mesma sequência. Assim, *prtR1* e *prtR* na estirpe W50, *rgp-1* na estirpe HG66, *rgpA* e *hagE* na estirpe 381 e *prtH* na estirpe W83, todos correspondem ao locus 1 das gingipains R e à gingipain R1 (Curtis *et al*, 2001). Os dados disponíveis sugerem que haverá duas cópias do mesmo gene nas estirpes W50 e 381. O alinhamento dos transcriptos, mostra que as diferenças entre ambos são residuais. O produto genético dos genes descritos como *prtR1* na estirpe (W50), *rgpB* (ATCC33277) e *rgp-2* (HG66) correspondem à gingipain R2. Finalmente, o gene responsável pela síntese da gingipain K e caracterizado em diversas estirpes foi denominado *kgp* (HG66), *prtK* (W50), *kgp* (33277), *prtP* (W12), *prtP* (W83) e *kgp(381)-hagD* (Curtis *et al*, 2001).

Apesar das diferentes designações dos genes, os polipéptidos produzidos pela sua expressão não variam significativamente (Figuras 1 a 3 no Anexo I).

Fitzpatrick, Wijeyewickrema & Pike (2009) reviram recentemente os domínios que constituem os polipéptidos produzidos por cada um dos genes de gingipains. O gene *rgpA* codifica um polipéptido de 1706 aminoácidos (Figura 4) que consiste

num pro-fragmento (que é removido para a activação da protease), um domínio catalítico com 45kDa e um C-terminal que apresenta quatro sub-domínios de hemaglutinação/adesinas (RgpA44, RgpA15, RgpA17 e RgpA27) (Potempa *et al*, 2000; Fitzpatrick, Wijeyewickrema & Pike, 2009) (Figura 4). O gene *rgpB* codifica um polipéptido de 736 aminoácidos (Figura 4) que consiste num pro-fragmento, um domínio catalítico e difere do produto genético de *rgpA* apenas no C-terminal, apresentando um domínio de adesão mais pequeno de cerca de 100 aminoácidos. Os domínios catalíticos destas proteases são praticamente idênticos, apresentando uma homologia de 99%, enquanto o pro-fragmento e o C-terminal apresentam maiores variações, com homologia de 72 e 51%, respectivamente (Fitzpatrick, Wijeyewickrema & Pike, 2009) (Figura 4). O produto do gene *kgp* é um polipéptido que varia entre os 1723 e os 1732 aminoácidos, dependendo das estirpes (Figura 4), e é constituído por um pro-fragmento, um domínio catalítico com 48kDa e um C-terminal com vários subdomínios de adesinas/hemaglutininas (Aduse-Opoku *et al*, 2000; Bialas *et al*, 2006; Fitzpatrick, Wijeyewickrema & Pike, 2009). Existem algumas variações numa região de cerca de 200 aminoácidos do C-terminal nas várias estirpes (Figura 4).

A elevada homologia entre a gingipain R1 e a gingipain R2 leva à sugestão de que estes genes resultaram de uma duplicação de um gene ancestral da gingipain R2, seguidos pela fusão de um destes genes com uma zona que codifica um domínio de adesão/hemaglutinina ou a duplicação do gene da R1, com perda da zona que codifica o C-terminal num dos duplicados (Potempa *et al*, 2003).

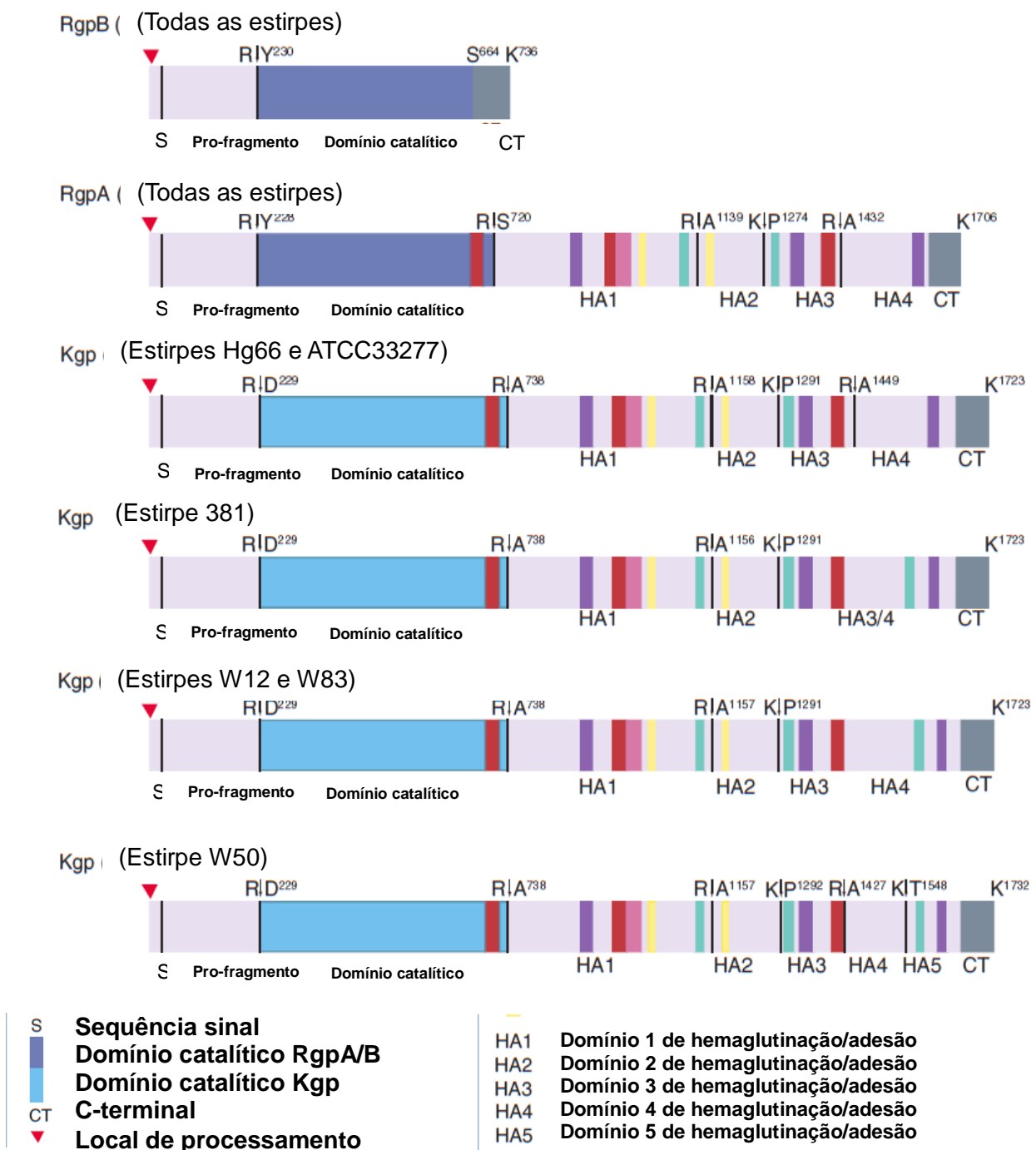


Figura 4- Transcripto primário da expressão dos genes RgpB, RgpA e Kgp. Apresentam-se ainda os domínios estruturais de cada um dos transcritos. Adaptado de Fitzpatrick, Wijeyewickrema&Pike, 2009



### 1.3.2.1.1.2 Produção e maturação das gingipains

A gingipain R1, produto do gene *rgpA*, apresenta três variantes conformacionais: *rgpA<sub>cat</sub>*, uma forma monomérica e normalmente solúvel, constituída apenas pelo domínio alfa catalítico, *mt-RgpA*, uma forma também monomérica, glicosilada e associada à membrana da célula e *HrgpA*, formado pelo domínio catalítico e outras proteínas identificadas como hemaglutininas/adesinas, apresentando-se na forma de um dímero (Potempa *et al*, 2000, Curtis *et al*, 2001, Sheets *et al*, 2008, Fitzpatrick, Wijeyewickrema & Pike, 2009).

A gingipain R2 apresenta apenas duas variantes conformacionais descritas *mt-RgpB* e *RgpB<sub>cat</sub>*, estruturalmente semelhantes às formas da gingipain R1 (Potempa *et al*, 2000, Curtis *et al*, 2001, Sheets *et al*, 2008, Fitzpatrick, Wijeyewickrema & Pike, 2009).

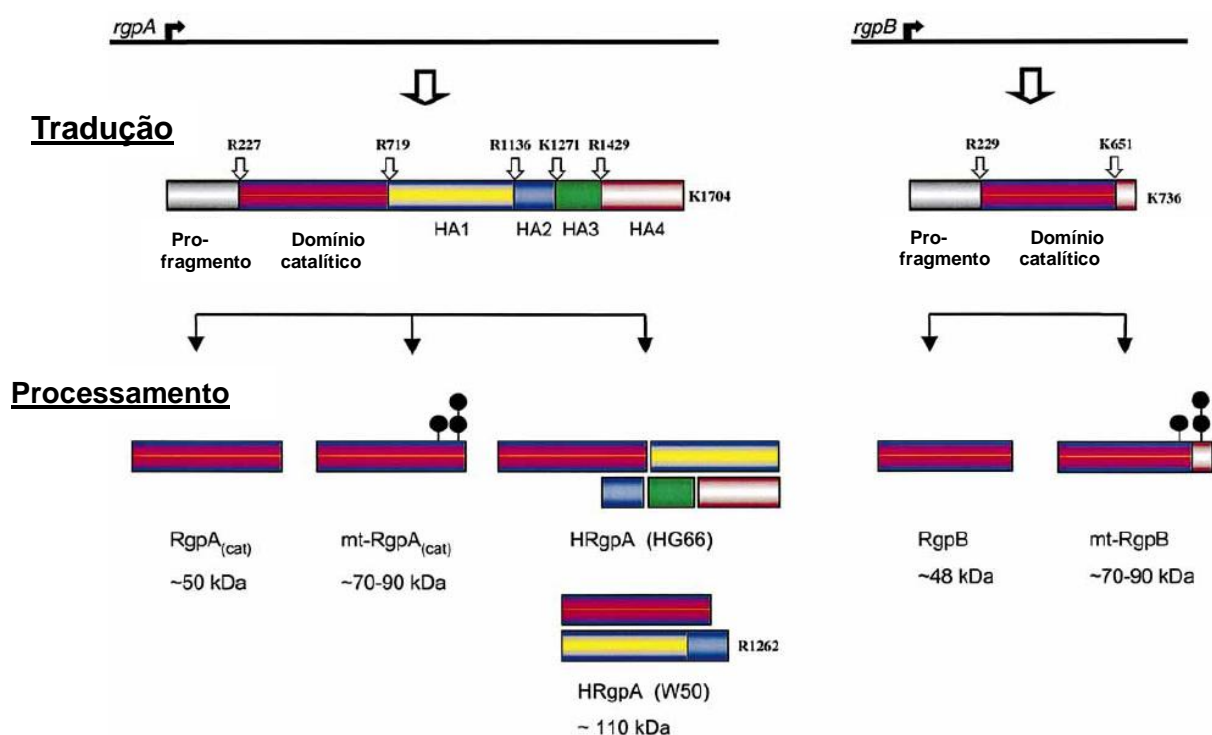


Figura 5- Representação esquemática do processamento pós-tradução do produto dos genes *rgpA* e *rgpB* e da formação da diferentes isoformas da *RgpA* e *RgpB*. As setas com os números nas pro-gingipains representam os locais de corte que vão originar as gingipains activas, assim como as diferentes isoformas, *RgpA<sub>cat</sub>* e *RgpB<sub>cat</sub>*, *mt-RgpA* e *mt-RgpB* e *HRgpA*. A modificação por glicosilação (representada pelos círculos pretos), permite a criação de isoformas (Adaptado de Potempa *et al*, 2000).

A Kgp pode existir numa forma solúvel (Aduse-Opoku *et al*, 2000, Rangarajan *et al*, 2005, Sheets *et al*, 2006, Urnowey *et al*, 2006) ou associada à *RgpA*/ *RgpB*, num complexo associado à membrana da célula (Curtis *et al*, 2001; O'Brien-Simpson *et al*, 2001), que tem ainda a capacidade de se ligar directamente à membrana lipídica de outras

células bacterianas ou do hospedeiro. Este complexo é capaz de degradar a elastina, com actividade 1,75 vezes superior à correspondente forma monomérica. O complexo apresenta uma estrutura globular com um diametro de 10 nm, ligado à superfície da célula e foi anteriormente designado de porphypain (Taki *et al*, 2005).

As gingipains são secretadas como zimogénios (Rangarajan *et al*, 2005, Seers *et al*, 2006) e ainda pouco se conhece sobre os seu mecanismo de activação. Sugere-se que a RgpB estará envolvida na activação da RgpA (Rangarajan *et al*, 2005), já que estudos *in vitro* mostram que a inactivação do gene *rgpB* leva à completa perda de função de mt-RgpA e RgpA<sub>cat</sub>. (Rangarajan *et al*, 2005). Este factor poderá explicar a necessidade de conservação destes 2 genes (Curtis *et al*, 2001). Além disso parece haver evidências de que as gingipains R, parecem ser necessárias para a activação da Kgp, já que resultados experimentais sugerem que na presença de uma estirpe mutante de *P. gingivalis* sem gingipains R, a gingipain K é processada de forma irregular, o que resulta numa diminuição acentuada da sua actividade (Potempa *et al*, 2000).

Há outras proteínas envolvidas na formação de gingipains funcionais e uma delas é a proteína transmembranar PorT que é essencial para o transporte dos produtos iniciais da tradução dos genes *rgpA*, *rgpB* e *kgp* do periplasma para a membrana externa da célula bacteriana, onde são processados. Na ausência desta proteína transmembranar, o produto da expressão destes genes não apresenta o péptido sinal e fica acumulado no periplasma (Sato *et al*, 2006).

#### **1.3.2.1.1.3 Estrutura das gingipains**

Actualmente, existe publicada apenas a estrutura cristalográfica da Gingipain R2 (Eichinger *et al*, 1999) (Figura 6), que revelou ser uma molécula em forma de dente, com cerca de 45Å de diâmetro e 40 Å de altura. A “coroa” do dente é constituída pelos 351 resíduos do N-terminal que correspondem ao domínio catalítico e a “raíz” é formada pelos restantes 84 aminoácidos, que constituem um domínio “Ig-like”. A função do domínio “Ig-like” não está totalmente esclarecida, mas a conservação de uma sequência de 43 aminoácidos parece estar envolvida nas modificações pós-tradução e ancoragem da protease à membrana de *P. gingivalis*

(Potempa *et al*, 2000; Fitzpatrick, Wijeyewickrema&Pike, 2009).

A perda dos dois últimos aminoácidos do C-terminal parece impedir a translocação desta protease para a membrana, tornando-a inactiva (Nguyen *et al*, 2007) o que mostra a importância da conservação deste C-terminal para a total actividade destas proteases.

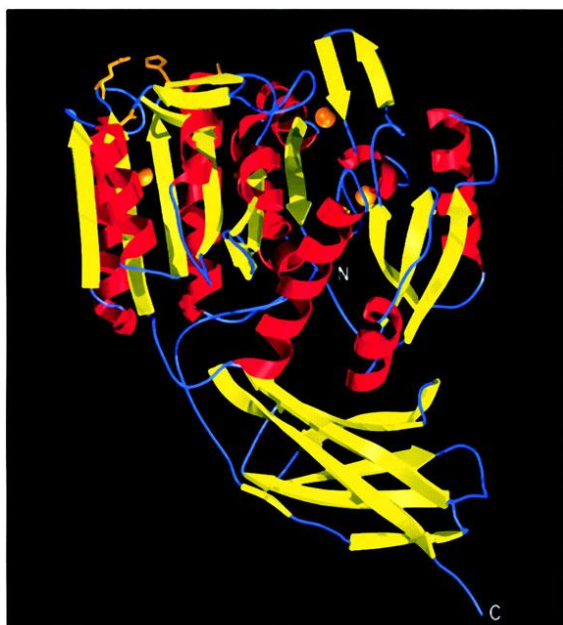


Figura 6- Estrutura cristalográfica da Gingipain R2 (Eichinger *et al*, 1999)



Figura 7- Estrutura cristalográfica de Gingipain R2, salientando o domínio "Ig-like" a amarelo, criada com o programa de análise de estruturas Pymol ([www.pymol.org/](http://www.pymol.org/))

#### 1.3.2.1.1.4 Características funcionais

Para exercer a sua função de peptidases, as gingipains necessitam de agentes redutores, e os iões metálicos parecem não ser necessários. A presença de cálcio não afecta a actividade enzimática, mas estabiliza a enzima. O pH de actuação das gingipains varia entre os 7.5-8.5, sendo os valores de 7.9-8.1 o pH óptimo. De todas as formas destas enzimas a HrgpA (Figura 5) é a menos estável apresentando uma semi-vida de 20 minutos na ausência de cálcio. Nas mesmas condições a RgpAcat e a mt-RgpA (Figura 5) apresentam semi-vidas de 10h (Curtis *et al*, 2001).

#### **1.3.2.1.1.5 Gingipains e virulência**

Várias evidências experimentais indicam que a virulência da *P. gingivalis* está fundamentalmente relacionada com a actividade proteolítica das gingipains (Potempa *et al*, 2003; Fitzpatrick, Wijeyewickrema & Pike, 2009). Estas evidências consistem em resultados que mostram que estirpes em que os genes responsáveis pela síntese das gingipains foram mutados, registam uma diminuição da virulência (Taki *et al*, 2005), bem como resultados em que a inibição das gingipains resulta numa perda de virulência (Taki *et al*, 2005). Além disso abundam estudos em que o efeito de proteases de *P.gingivalis* sobre algumas das proteínas do hospedeiro é estudado “in vitro”. São várias as moléculas do hospedeiro que estão descritas como sendo alvos da proteólise por gingipains. As moléculas degradadas pelas gingipains estão associadas a processos fisiológicos do hospedeiro como defesa imunitária, permeabilidade vascular e adesão celular. Das moléculas intervenientes directamente na resposta imunitária foi descrita a digestão pelas gingipains de componentes do sistema de complemento (Wingrove *et al*, 1992), interleucinas (Calkins *et al*, 1998; Stathopoulou *et al*, 2009), metaloproteinases (Decarlo *et al*, 1997). No que se refere a proteínas da matriz extracelular são clivados o colagénio, lamininas e fibronectina (Andrian, Grenier & Rouabhia, 2004; Taki *et al*, 2005; Sheets *et al*, 2006). Quanto às moléculas envolvidas na permeabilidade vascular e em cascatas de coagulação, o fibrinogénio (Sheets *et al*, 2006), a protrombina (Imamura *et al*, 1997), a caliceína/quinina e a proteína C são também alvos proteolíticos (Holt & Ebersole, 2005; Chang, 2009).

A acção das gingipains sobre as moléculas do hospedeiro descritas, podem ser relacionadas com os sinais clínicos da infecção por *P.gingivalis* como o exacerbar e descontrolo da reacção inflamatória, a desagregação do tecido epitelial, e alterações na hemostase do tecido periodontal.

#### **1.3.2.1.1.5.1 Adesão/invasão**

As gingipains R parecem participar indirectamente no factor de virulência adesão uma vez que participam no processamento da fimbrilina, o principal componente das fímbrias, já que na ausência destas, a fimbrilina se mantém numa forma inactiva, pró-fimbrilina e a célula apresenta poucas ou nenhuma

fímbrias activas (Potempa *et al*, 2000; Aduse-Opoku *et al*, 2000, Curtis *et al*, 2001, Holt & Ebersole, 2005, Nguyen *et al*, 2007, McAlister *et al*, 2009).

A invasão celular pela *P. gingivalis* resulta num rearranjo dos microfilamentos, microtúbulos e da actina do citoesqueleto e ainda uma modulação da concentração de cálcio no citosol da célula. No entanto, pouco se sabe sobre as moléculas que actuam directamente sobre estes componentes celulares (Katz *et al*, 2002, Amano A, 2003; Hasegawa *et al*, 2008).

#### **1.3.2.1.1.5.2 Aumento da permeabilidade vascular**

As gingipains R estarão particularmente envolvidas no aumento da permeabilidade vascular pela activação da pre-caliceína, que provoca a libertação da bradicinina, levando à exsudação de plasma e de eritrócitos para o tecido epitelial (Eichinger *et al*, 1999, Sheets *et al*, 2006, Fitzpatrick, Wijeyewickrema & Pike, 2009). Todas as gingipains provocam o aumento da permeabilidade vascular pela libertação de bradicinina a partir do quinínogénio, o que provoca um aumento do volume de fluído crevicular, verificando-se edema gengival, um sinal clássico de doença periodontal (Holt & Ebersole, 2005, Sheets *et al*, 2006).

A activação da protrombina pelas gingipains R, pela clivagem de pro-péptidos, gera trombina, uma das principais moléculas presentes em estados inflamatórios. A trombina é um activador plaquetar, converte o fibrinogénio em fibrina e aumenta a permeabilidade vascular, o que contribui para o aumento do volume do fluído crevicular, a expressão de IL-1e prostaglandinas. Este aumento na expressão de interleucinas estimula a reabsorção óssea e a quimiotaxia dos leucócitos. Estudos de Imamura *et al* (2001), sugerem que as gingipains R estão envolvidas na activação da trombina, classificando-as como os mais potentes activadores de origem bacteriana, sendo mais eficaz a gingipain R1 que a R2 (Holt & Ebersole, 2005). A gingipain K parece ter maior especificidade para o fibrinogénio, convertendo-o também em fibrina, que contribuirá para a tendência à hemorragia (Holt & Ebersole, 2005).

Estudos de Travis *et al*, 1999, sugerem que as gingipains R, e mais eficazmente a gingipain R1, activam a proteína anticoagulante C, o que

contribuirá para a propensão à hemorragia, nos locais com doença periodontal activa (Hosotaki *et al*, 1999; Fitzpatrick, Wijeyewickrema & Pike, 2009).

#### **1.3.2.1.1.5.3 Actuação sobre os mecanismos de defesa do hospedeiro**

A instalação da doença periodontal implica que os mecanismos de defesa do hospedeiro não consigam limitar o crescimento bacteriano de algumas espécies em particular. De forma a sobreviver na bolsa periodontal, os microrganismos têm de sobreviver aos mecanismos de defesas. O stress oxidativo imposto a microrganismos (principalmente aos anaeróbios obrigatórios), é um dos mecanismos imunitários, já que durante a invasão e infecção dos tecidos periodontais, são libertados pelos neutrófilos e macrófagos, radicais livres de oxigénio como superóxidos e peróxido de hidrogénio (Sheets *et al*, 2008).

Um mecanismo possível encontrado pela *P. gingivalis* para resistir ao stress oxidativo parece ocorrer com o auxílio das gingipains, fundamentalmente a gingipain R1 e gingipain K, que ao ligar heme à superfície da célula bacteriana, anula os efeitos dos radicais livres de oxigénio produzidos por células imunitárias, que poderiam potencialmente levar à lise da célula bacteriana (Sheets *et al*, 2008).

A actuação das gingipains sobre o sistema imunitário passa também pela degradação de imunoglobulinas e de componentes do sistema complemento, como já foi referido. Estudos de Wingrove *et al* (1992), sugerem que a gingipain R1 degrada os péptidos C3 e C5 do sistema complemento, conduzindo à sua activação, o que provocaria um grande influxo de neutrófilos para a bolsa periodontal, contribuindo para o evoluir da doença periodontal. A degradação de C5 pelas gingipains leva à formação de um componente semelhante ao C5a, que apresenta um potente efeito quimiotáxico para os neutrófilos, contribuindo para a manutenção da resposta inflamatória (Wingrove *et al*, 1992).

Por outro lado, a gingipain R1, mais precisamente rgpAcat e a ainda Kgp, em estudos *in vitro*, mostraram ter capacidade para degradar os componentes C3a, C3b e C5. A degradação de C3b pode impedir a opsonização, aumentando a probabilidade de sobrevivência das bactérias (Wingrove *et al*, 1992).

Foi ainda descrita a activação dos receptores PAR1,2 e 4 (proteinase-activated receptors) pelas gingipains R1 e R2. Os receptores PAR-2 são expressos por

células que estão directamente envolvidas na doença periodontal como fibroblastos gengivais, células epiteliais e osteoblastos. A activação destes receptores induz a secreção de citocinas pro-inflamatórias, (como a IL-6 que é um potente factor de reabsorção óssea), e de MMP's (proteases envolvidas na degradação dos tecidos periodontais). Para além disso, a activação destes receptores leva ainda a um aumento da permeabilidade vascular, da quimiotaxia dos neutrófilos. (Holzhausen, Spolidorio & Vergnolle, 2005).

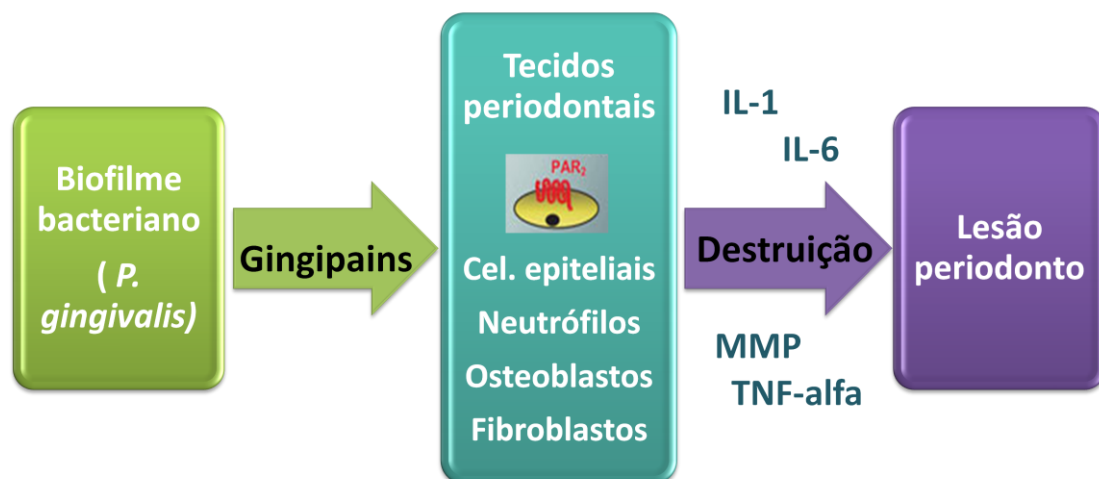


Figura 8- Baseado no modelo teórico sugerido por Holzhausen, Spolidorio & Vergnolle, (2005) acerca da possível participação dos receptores PAR-2, na periodontite, com base nos estudos de Vergnolle *et al*, 2001 e Coughlin & Camerer, 2003. Ocorrerá a activação destes receptores pelas gingipains R, o que estimulará a secreção de mediadores pró-inflamatórios, que consequentemente induzirão a lesão do periodonto.

O TNF-alfa está descrito como uma citocina pro inflamatória que promove a quimiotaxia dos neutrófilos para locais com doença periodontal activa e estimula a expressão de outras interleucinas pró-inflamatórias (Calkins *et al*, 1998).

Não só as gingipains R, como também a K, têm a capacidade de desregular a rede de citocinas e afectar as reacções inflamatórias, a nível local, o que funciona a favor da *P. gingivalis*.

Foi ainda sugerido, pelos estudos de Tada *et al* (2002) que as gingipains R degradariam a proteína membrana CD14, expressa principalmente em monócitos, neutrófilos e em fibroblastos gengivais e responsável pela activação

destas células quando em contacto com componentes bacterianos como o LPS bacteriano (Tada *et al* 2002). A activação destes diferentes tipos de células tem resultados distintos. Os fibroblastos gengivais, quando activados por motivos bacterianos como o LPS, produzem várias moléculas inflamatórias como a IL-8, que são libertadas via CD14, e portanto a sua degradação inibiria a libertação de IL-8, o que diminuiria a resposta inflamatória (Tada *et al* 2002). Estes autores, através de SDS-PAGE e Immunoblot, obtiveram vários fragmentos da digestão do receptor CD14 pela gingipain R1 “in vitro”, enquanto sugerem que o efeito da gingipainK será apenas residual.

Estudos de Into *et al* (2006) sugerem que o inibidor das proteases secretadas pelos neutrófilos (SLPI) é também um alvo proteolítico das gingipains. Esta proteína é homodimérica, não glicosilada de 107 aa, com uma forma de boomerang, que apresenta ortólogos em diversos organismos como ratos, porcos e macacos (Into *et al*, 2006). Está presente em diversos fluídos fisiológicos como a saliva e o fluído bronquial e apresenta várias funções que incluem actividade anti-inflamatória, acção antimicrobiana e a promoção da cicatrização de lesões, contribuindo para a manutenção da saúde oral. A maior concentração de SLPI está presente no fluído crevicular e não na saliva glandular. Esta molécula pode ser sintetizada pelas células gengivais epiteliais, particularmente as do sulco gengival, que são estimuladas pelos lipopolissacarídeos (LPS) das bactérias da placa subgengival, pelas elastases dos neutrófilos e ainda por citocinas derivadas dos tecidos inflamados (Williams, S, 2006; Cox, S. *et al*, 2006, Into *et al*, 2006). É um potente inibidor de proteases serínicas como as elastases dos neutrófilos e a catepsina G, presentes no fluído crevicular.

A elafina é uma molécula envolvida na iniciação e desenvolvimento da inflamação. A sua função primordial é prevenir a lesão potencial dos tecidos, pela acção proteolítica de enzimas secretadas por células inflamatórias, como as EPN, inibindo-as. É produzida localmente pelas células da mucosa. (Williams S, 2006). A elafina resulta da proteólise do C-terminal da trappina 2, produzindo-se uma proteína de 9,9KDa, com 117 aminoácidos, cujo alvo primordial são as elastases produzidas pelos neutrófilos (Williams, S, 2006). A acção destes dois inibidores, pela inibição de proteases do hospedeiro, protegem localmente os tecidos da



destruição durante uma resposta inflamatória, na qual estas proteases estão presentes em elevadas concentrações (Into *et al*, 2006).

#### 1.3.2.1.1.5.4 Degradação de proteínas da matriz extracelular

As gingipains estarão envolvidas na degradação das proteínas que estabelecem a ligação entre as células endoteliais e epiteliais, levando à sua morte, comprometendo a integridade dos tecidos.

Está descrita a capacidade das gingipains clivarem as moléculas de adesão celular (Cellular Adhesion Molecules, CAMs), moléculas estas que são essenciais para a sobrevivência das células endoteliais, já que actuam selando as junções intercelulares e estão envolvidas no crescimento, diferenciação e apoptose celular. Estudos de Sheets e colaboradores (2006) sugerem que “*in vitro*”, as várias gingipains actuam diferencialmente sobre as diferentes CAMs (Tabela I).

Tabela I – Acção selectiva das gingipains sobre as diferentes CAMs e efeitos nos processos celulares do hospedeiro (construído a partir de Katz *et al*, 2002 e Sheets *et al*, 2006)

| Gingipain                | CAM clivada      | Actuam sobre  |
|--------------------------|------------------|---|
| <b>RgpA e Kgp</b>        | CD 99            | Contração celular e criação de poros nos capilares  |
| <b>Kgp</b>               | Integrina 1 Beta | Justaposição celular                                |
| <b>HrgpA e Kgp</b>       | N-caderina       | Justaposição celular                                |
| <b>HrgpA, RgpB e Kgp</b> | VE-caderina      | Justaposição celular e organização do citoesqueleto |
| <b>HrgpA, RgpB e Kgp</b> | E-caderina       | Justaposição celular                                |

Especialmente as Rgp's mostraram a capacidade de induzir a perda de viabilidade em fibroblastos gengivais e células endoteliais. Esta actividade sugere que as gingipains trabalham em conjunto para clivar as CAMs, favorecendo o desenrolar da doença periodontal (Sheets *et al*, 2008).

Outra evidência na doença periodontal é a presença de células em apoptose. A

apoptose consiste na morte celular programada (Sheets *et al*, 2006), em que as caspases estão envolvidas, como a caspase 3, promovendo a formação de poros, fragmentação celular e fragmentação do DNA. Como as gingipains provocam apoptose das células endoteliais e fibroblastos (Urnowey *et al*, 2006; Sheets *et al*, 2006; Sheets *et al*, 2008), foi sugerido que o fizessem quer por activação da procaspase 3 (Urnowey *et al* 2006; Sheets *et al*, 2008), quer por uma via independente da activação da caspase 3, em que a HrgpA e a RgpB provocariam a apoptose. A clivagem das CAMs pelas gingipains provoca, nas células, efeitos semelhantes aos das células em apoptose, o que leva à sugestão de que as gingipains induzem a apoptose das células que compõem o periodonto (Urnowey *et al*, 2006).

As MMP's são expressas, por células do hospedeiro como leucócitos e fibroblastos, em resposta à presença de espécies bacterianas patogénicas na bolsa periodontal e degradam, para além do colagénio, componentes da matriz extracelular como fibronectina e lamininas. Em circunstâncias normais, estas MMP's actuam na remodelação e “*turnover*” dos tecidos periodontais e a sua acção é controlada por inibidores tecidulares (Tissue Inhibitors Metallo Proteinases- TIMPs). Os TIMP-1 actuam no tecido gengival. As gingipains, de acordo com a revisão de de Holt & Ebersole (2005) parecem inactivar o TIMP-1, impedindo assim o controlo da destruição proteolítica do periodonto. Além disso as gingipains estimulam a produção de MMP-2 (cliva colagénio tipo IV, V, VII e X) e de MMP-9 (cliva colagénio tipo IV e V, estimula a quimiotaxia dos neutrófilos e parece estar envolvida na reabsorção óssea) pelos fibroblastos e células epiteliais (Holt & Ebersole, 2005, UniProtKb Database). As MMP 1 (cliva colagénio tipo I, II, III, VII e X) e 9 são activadas pela Kgp e a MMP-3 (degrada fibronectina, lamininas, colagénio tipo III, IV, IX e X e ainda os proteoglicanos das cartilagens) pelas Rgp's (Andrian, Grenier & Rouabhia, 2004, UniProtKb Database).

#### **1.3.2.1.1.5.5- Envolvimento na reabsorção óssea**

A osteoprotegerina (OPG) é uma molécula envolvida na inibição da diferenciação dos osteoclastos, regulando assim a osteoclastogénese e inibindo a reabsorção óssea, um dos fenómenos clínicos observados na periodontite.

Um estudo de Yasuhara *et al* (2009), mostrou que a Gingipain K degrada a OPG, o que leva a um aumento da diferenciação dos osteoclastos e, portanto,

contribuindo para a reabsorção óssea, um dos fenómenos clínicos observados na periodontite. As gingipains R não têm o mesmo efeito na diferenciação dos osteoclastos, o que pode ser explicado pela baixa degradação da OPG por esta protease (Yasuhara *et al*, 2009). As conclusões do estudo destes autores permitem-nos ordenar de forma decrescente, a contribuição de cada gingipain na reabsorção óssea: gingipain K > gingipain R2 > gingipain R1 (Yasuhara *et al*, 2009).

Assim, sugere-se que as gingipains estão não só envolvidas na degradação dos tecidos moles e na inflamação do periodonto, mas também na estimulação da osteoclastogénese e reabsorção óssea, característica da doença periodontal.

## **1.4 Objectivos da tese**

Da revisão bibliográfica precedente é notória a quantidade de informação acumulada sobre gingipains, *Porphyromonas gingivalis* e periodontite. São conhecidas e descritas na literatura várias moléculas que interagem com as gingipains e são sugeridos contributos desta interacção para os sinais clínicos da doença periodontal. Utilizando a informação estrutural disponível na base de dados UniprotKB é feita uma análise bioinformática de algumas das interacções entre gingipains e moléculas do hospedeiro, com o objectivo de esclarecer o detalhe molecular dessa interacção e propôr interacções idênticas entre gingipains e outras moléculas.

## **2 - Material e Métodos**

A análise bioinformática das interações estabelecidas entre as gingipains e moléculas do hospedeiro foi realizada com recurso a ferramentas “freeware” disponíveis nas bases de dados internacionais. O estudo incidiu sobre as gingipains e moléculas do hospedeiro cuja interação estava descrita na literatura e que tinham sequências disponíveis nas bases de dados. Para a análise das interações foram seguidos vários passos que são descritos de seguida.

### **2.1 – Caracterização das gingipains**

Iniciou-se o trabalho pela definição da sequência de aminoácidos a considerar para cada uma das 3 gingipains conhecidas. Como foi referido na revisão bibliográfica, vários grupos descreveram e depositaram em alturas diferentes sequências de proteínas nas bases de dados que correspondem a gingipains isoladas de estirpes diferentes e, por vezes, fragmentos de gingipains. Assim foi necessário iniciar este estudo pela escolha da sequência a utilizar na obtenção dos modelos.

#### **2.1.1 Sequências homólogas**

A sequência de aminoácidos das proteínas usadas neste estudo foi obtida no UniProtKb (<http://www.uniprot.org/>). A procura de proteínas homólogas foi feita com o algoritmo BLAST. O alinhamento das diversas variantes de cada protease obteve-se com o programa ClustalW2. Os algoritmos BLAST e ClustalW2 estão disponíveis como freeware em [www.uniprot.org](http://www.uniprot.org).

#### **2.1.2 Domínios funcionais**

A pesquisa de domínios de cada proteína, foi realizada com o programa DomainSweep, disponível no site <http://genus.embnet.dkfz-heidelberg.de/menu/cgi-bin/w2h-open/w2h.open/w2h.startthis>.

### 2.1.3 Modelos

O modelo tridimensional da Gingipain R2, foi obtido a partir de dados de cristalografia disponíveis no site <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>, com o código 1cvr. Como é a única gingipain com estrutura cristalográfica determinada, os restantes modelos das gingipains foram gerados através do programa MODWEB (<http://modbase.compbio.ucsf.edu/ModWeb20-html/modweb.html>) e anotados no programa de análise de estruturas Pymol (<http://www.pymol.org/>).

### 2.1.4 Outros dados

Outros dados como a topologia das proteínas foram construídas por pedido dirigido ao site PDBsum (<http://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/databases/pdbsum/upload.html>).

## 2.2 – Caracterização das moléculas do hospedeiro

A obtenção da informação relativa às moléculas do hospedeiro que estavam descritas na literatura como substratos das gingipains foi obtida da base de dados UniprotKB fazendo uma pesquisa pelo nome da proteína. À semelhança das gingipains foi posteriormente utilizado o algoritmo BLAST para determinar a sequência mais indicada para os estudos a realizar.

A estrutura tridimensional dos substratos das gingipains foi também obtida a partir de dados cristalográficos, disponíveis no site <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>. Nos casos em que foi considerado necessário, foi solicitada a definição da topologia das moléculas por pedido dirigido ao site PDBsum (<http://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/databases/pdbsum/upload.html>).

## 2.3 – Caracterização da PrtT e periodontain


A análise dos resultados anteriores sugeriu que fossem identificadas outras proteases de *P.gingivalis* com acção sobre os inibidores naturais das elastases. Assim foram identificadas as proteases de cisteína PrtT e periodontain. Estas





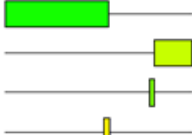
proteínas tinham a sua sequência depositada na base de dados do UniprotKB. Os modelos destas proteínas foram construídos a pedido, usando o programa Geno3D (<http://pbil.ibcp.fr/htm/index.php>) que permite que se escolha a estrutura modelo a utilizar.

## 3-Resultados e Discussão

### 3.1 Caracterização das gingipains


O estudo das gingipains neste trabalho foi iniciado pela sua caracterização estrutural. Para esse efeito foi necessário determinar que sequências estavam depositadas nas bases de dados e que informação adicional havia sobre essas sequências. As tabelas que se seguem resumem a informação disponível para as 3 gingipains de *P.gingivalis*. Verifica-se que há 3 produtos genéticos que originam proteases designadas de forma diferente por investigadores ou grupos distintos. No presente estudo as designações utilizadas serão gingipain R1, gingipain R2 e gingipain K.




Tabela II- Tabela resumo com informação referente às diversas variantes da gingipain R1, obtidas na base de dados UniProtKb. As cores reflectem a percentagem de identidade entre as sequências de 0%  100% ([www.uniprot.org](http://www.uniprot.org)).

| Designação  | Gene                | Estirpe | Nº de aminoácidos | Alinhamento local   | Uniprot ID | Referência                      |
|---|---------------------|---------|-------------------|---|------------|---------------------------------|
| <b><u>PrpR1</u></b>   | <u><i>prtR1</i></u> | W50     | 1706              | <br>1 1706  | Q51838     | Aduse-Opoku <i>et al</i> , 1995 |
| <b><u>Protease PrtR</u></b>   | <u><i>prtR</i></u>  | W50     | 1706              | <br>65 67   | Q51839     | Kirszbaum <i>et al</i> , 1995   |
| <b><u>Arg-gingipain-1 proteinase</u></b>  | <u><i>rgp-1</i></u> | H66     | 1704              | <br>2 1706  | Q51816     | Pavloff <i>et al</i> , 1995     |
| <b><u>Hemagglutinin/protease</u></b>  | <u><i>hagE</i></u>  | 381     | 1687              | <br>20 1706 | Q9R9B7     | Han <i>et al</i> , 1997         |
| <b><u>Gingipain R1</u></b><br><b><u>(Gingipain 1); (Arg-gingipain); (RGP-1)</u></b> | <u><i>rgpA</i></u>  | 381     | 991               |             | P28784     | Okamoto <i>et al</i> , 1995     |

Os dados apresentados mostram que as diferentes sequências das gingipains R1, têm uma homologia superior a 90% entre elas, sendo que muitas das sequências depositadas podem ser consideradas sinónimos pois o alinhamento em algumas das variantes é praticamente total (PrpR1, Protease PrtR, Arg-gingipain-1 proteinase, Hemagglutinin/protease). Outras das variantes parecem


ser fragmentos como é o caso da Gingipain R1e Protease PrtH em que a homologia superior a 90% da sequência acontece para apenas uma porção da molécula. Estes resultados evidenciam o cuidado que é necessário ter quando se pretende fazer uma análise mais detalhada das sequências depositadas nas bases de dados pois muitas vezes a designação da sequência não é suficiente para garantir que se trata da proteína que se pretende analisar. As buscas e comparações podem e devem ser feitas com base nas sequências de aminoácidos ou nucleótidos que serão a única forma de garantir que estamos a analisar a proteína pretendida.


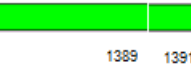
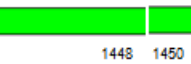
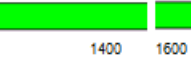
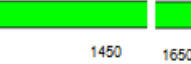
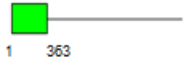
Tabela III- Tabela resumo com informação referente às diversas variantes da gingipain R2, obtida na base de dados UniProtKb. As cores reflectem a percentagem de identidade entre as sequências de 0%  100% ([www.uniprot.org](http://www.uniprot.org)).

| Designação   | Gene          | Estirpe | Nº de aminoácidos | Alinhamento local   | Uniprot ID | Referência                        |
|--|---------------|---------|-------------------|---|------------|-----------------------------------|
| PrtrII   | <i>prtRII</i> | W50     | 736               | <br>1 736   | B2RKU0     | Slakeski et al, 1998              |
| <b>Gingipain R2;<br/>(Gingipain 2) (Arg-gingipain) (RGP-2)</b> | <i>rgp2</i>   | H66     | 736               | <br>246 254 | P95493     | Mikolajczyk-Pawlinska et al, 1998 |
| Arginine-specific cysteine proteinase (Arg-gingipain)          | <i>rgpB</i>   | 33277   | 736               | <br>510 515 | Q51844     | Nakayama, 1997                    |

As várias sequências depositadas na base de dados UniProt para a Gingipain R2 revelam diferenças menores que as de gingipain R1, observando-se a conservação do número de aminoácidos em todas as variantes. Neste caso, as sequências depositadas diferem apenas na estirpe da qual foram isoladas sendo que nas 3 estirpes a percentagem de homologia menor é de 98%.



Tabela IV- Tabela resumo com informação referente às diversas variantes da Gingipain K, obtida na base de dados UniProtKb. As cores reflectem a percentagem de identidade entre as sequências de 0%  100% ([www.uniprot.org](http://www.uniprot.org)).

| Designação                                 | Gene           | Estirpe | Nº de aminoácidos | Alinhamento local   | Uniprot ID | Referência                            |
|--|----------------|---------|-------------------|---|------------|---------------------------------------|
| <i>Lysine-specific cysteine proteinase</i> | <u>prtK</u>    | W50     | 1732              | <br>1 1732      | O07442     | Slakeski <i>et al</i> , 1999          |
| <i>Porphygipain</i>                        | <u>prtP</u>    | W12     | 1732              | <br>1389 1391   | Q51817     | Barkocy-Gallagher <i>et al</i> , 1996 |
| <i>Lysine specific cysteine protease</i>   | <u>prtP</u>    | W83     | 1732              | <br>1448 1450   | O52050     | Lewis and Macrina, 1998               |
| <i>Lys-gingipain</i>                       | <u>kgp</u>     | H66     | 1723              | <br>1400 1600  | P72197     | Pavloff <i>et al</i> , 1997           |
| <i>Lys-gingipain</i>                       | <u>kgp</u>     | 33277   | 1723              | <br>1450 1650 | P72194     | Okamoto <i>et al</i> , 1996           |
| <i>Cysteine protease</i>                   | <u>kgp-381</u> | 381     | 364               | <br>1 363     | P96966     | Han <i>et al</i> , 1998               |

De acordo com os resultados apresentados na Tabela IV, verifica-se que também no caso da gingipain K há uma grande conservação na sequência de aminoácidos das diversas variantes. As 3 primeiras variantes listadas na tabela têm uma homologia de 99% e as duas seguintes uma homologia de 88% uma vez que os limites da proteína considerados são diferentes (enquanto que nas primeiras sequências a proteína considerada tem 1732 aminoácidos nas duas seguintes tem 1723). No entanto, como é visível pela cor do alinhamento local apresentado na tabela as sequências sobreponíveis têm uma homologia superior a 90%. A sequência depositada como “cysteine protease” parece corresponder apenas a um fragmento da gingipain K.

### 3.1.1 Domínios funcionais das gingipains

Uma vez que o objectivo da análise da estrutura das gingipains neste trabalho é o esclarecimento da sua função molecular, foi considerado essencial fazer o estudo dos domínios funcionais identificáveis nas sequências analisadas. Considerando o produto genético mais longo para cada uma das proteínas descritas nas tabelas II, III e IV, e utilizando o programa “*DomainSweep*” obtivemos correspondências da sequência introduzida com os domínios apresentados na tabela I do Anexo II. Os domínios identificados coincidem essencialmente com os descritos por Fitzpatrick *et al* (2009).

Os dados obtidos mostram que em termos de domínios significativos (ou seja que são descritos em mais que uma base de dados) as gingipains são muito semelhantes, variando apenas a extensão de cada domínio. O domínio de adesinas é aquele em que essa diferença é mais significativa, verificando-se que no caso da gingipain R2, este domínio é bastante menos extenso do que as outras gingipains, como também se pode observar na figura 4. Independentemente da localização exacta de cada um dos domínios, o que é mais evidente nos resultados é o facto de haver 3 domínios partilhados por cada uma das gingipains com funções já conhecidas e descritas na literatura: o domínio do pro-péptido, os domínios de protease responsáveis pela actividade enzimática da molécula e domínios de adesão responsáveis pela inserção da protease na membrana celular bacteriana bem como pela capacidade das gingipains de se ligarem a outras moléculas (actividade de hemaglutinina).

O resultado mais interessante desta análise foi a classificação das gingipains na superfamília de proteínas “caspase-like”, ou seja proteínas em que foi identificado um domínio de caspase. Esta característica tinha sido sugerida para a gingipain R2, uma vez que a *Porphyromonas gingivalis* é muitas vezes descrita como indutora de apoptose por várias vias (Sheets *et al*, 2006), algumas delas podendo ser iniciadas pela presença destes domínios de caspase.

### **3.2 Actividade proteolítica das gingipains**

Usando a informação estrutural disponível para as várias moléculas que têm sido descritas como alvos da actividade proteolítica das gingipains, foram construídos modelos da estrutura tridimensional destas moléculas para verificar se os resíduos alvo da acção proteolítica destas enzimas estariam acessíveis à protease. Convém aqui salientar que nem todas as moléculas descritas na revisão bibliográfica como alvos da degradação enzimática por gingipains puderam ser alvo desta análise. Assim, proteínas com sequências não determinadas não puderam ser analisadas. Por outro lado, as proteínas que se sabe serem alvo de corte pelas gingipains mas que constituem proteínas integrais da membrana das células do hospedeiro também não foram consideradas, apesar de nalguns casos estar determinada a estrutura cristalográfica de partes destas proteínas. A não inclusão destas moléculas na análise prende-se com o facto de que as estruturas determinadas para estas moléculas serem muitas vezes parciais e não haver informação disponível sobre que porções das moléculas estarão acessíveis ao corte pelas gingipains. Assim moléculas como as caderinas, a integrina beta-1 e o receptor CD14 foram eliminados desta análise.

As moléculas analisadas como substrato enzimático das gingipains foram moléculas que não são proteínas integrais de membranae moléculas em já tinha sido descrita a digestão “in vitro” muitas vezes com a identificação do local de corte (SLPI, elafina, TNF-alfa, Protrombina, pro-MMP1 e pro-MMP3).

#### **3.2.1 Actuação sobre inibidores de elastase**

Algumas das moléculas do hospedeiro descritas como alvo das gingipains que não se encontram associadas à membrana e para as quais era já conhecida estrutura cristalográfica incluíam inibidores de elastases que, pelas implicações clínicas que podem ter, foram seleccionadas para uma análise mais detalhada.

### 3.2.1.1 SLPI

Usando a informação estrutural disponível para as várias moléculas que têm sido descritas como alvos da actividade proteolítica das gingipains, foram construídos modelos da estrutura tridimensional destas moléculas para verificar se os resíduos alvo da acção proteolítica destas enzimas estariam acessíveis à protease.

Utilizando gingipain R1 purificada e SLPI, Into e colaboradores (2006) demonstram, por imunotransferência, a clivagem da SLPI pela gingipain R1, propondo que essa clivagem deverá ocorrer num dos 5 resíduos de arginina (45, 62, 83, 84, 113), presentes nos 2 domínios desta molécula.

Para obter um modelo do domínio 1 da SLPI, recorremos ao programa Modweb e obtivemos um modelo de parte deste domínio, do aminoácido 27 ao 65. A figura 9 ilustra esse modelo e encontram-se destacados a vermelho os resíduos de Arg 45 e 62, que se encontram à superfície e por isso acessíveis à gingipain R1.

Na figura 10, estão representados os resíduos de arginina da molécula de SLPI num modelo da estrutura tridimensional do domínio 2 desta molécula. Este modelo tridimensional foi obtido a partir de dados de cristalografia do complexo SLPI-elastase (Koizumi *et al*, 2008) e anotado no programa de análise de estruturas Pymol.

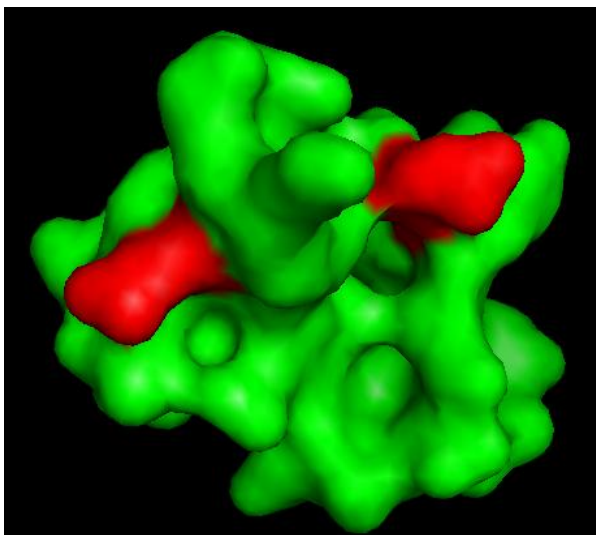


Figura 9 – Modelo tridimensional da superfície de parte do domínio 1 da SLPI com indicação dos resíduos de arginina 45 e 62 a vermelho, obtido com o programa Modweb e anotado no programa Pymol

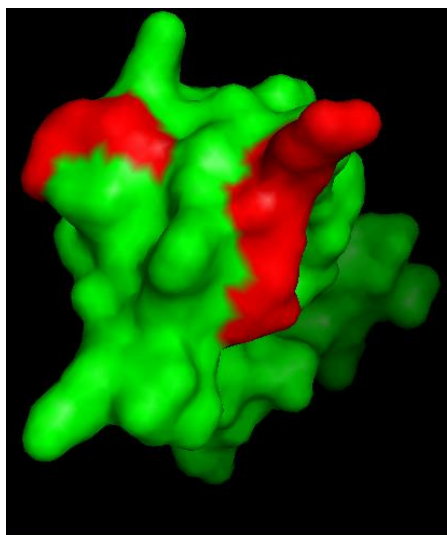


Figura 10 – Representação tridimensional da superfície da estrutura do domínio 2 de SLPI com indicação dos resíduos de arginina 83,84 e 113 a vermelho.

É evidente destas representações que há 5 resíduos (a vermelho nas figura 9 e 10) de arginina à superfície que poderão ser clivados pela gingipain R1.

Segundo Ito e outros (2006), os fragmentos obtidos da digestão da molécula da SLPI pela gingipain R1 levam à formação de dois fragmentos de 6 e 14 kD. Uma vez que a SLPI apresenta 130 aminoácidos, as argininas nas posições 62, 83 e 84 serão locais possíveis de corte, levando à formação de fragmentos com os tamanhos observados.

O corte pela gingipain R2, de acordo com os autores, será idêntico já que não observaram diferenças na proteólise da SLPI pela gingipain R1 e R2.

As figuras 11 e 12 mostram, respectivamente, o alinhamento da estrutura primária destas proteases e o alinhamento da estrutura tridimensional, evidenciando as semelhanças estruturais entre elas.

|   |                       |    |
|---|-----------------------|----|
| LKTQIDRTIHYERNITTEDKWLGGQALCIASAEAGGPSADNGESDIQHENI           | IANLLTQYGYI           | R2 |
| LKTQIDRTIHYERNITTEDKWLGGQALCIASAEAGGPSADNGESDIQHENV           | IANLLTQYGYI           | R1 |
| *****   |                       |    |
| KIIKCYDPGVTPKNIIDAFNGGISLVNYTGHGSETAWGTS                      | SHFGTTHVKQLTNSNQLPFIE | R2 |
| KIIKCYDPGVTPKNIIDAFNGGISLVNYTGHGSETAWGTS                      | SHFGTTHVKQLTNSNQLPFIE | R1 |
| *****   |                       |    |
| DVACVNGDFLYNVPCFAEALMRAQKDGKPTGTVAIIASTINQSWASPMRGQDEMNEILCE  |                       | R2 |
| DVACVNGDFLFSPMPCFAEALMRAQKDGKPTGTVAIIASTINQSWASPMRGQDEMNEILCE |                       | R1 |
| *****   |                       |    |
| KHPNNIKRTFEGGVTMNGMFAMVEKYKKDGEKMLDTWTVEFGDPSLLVRTLVP         | TKMQVTAPZ             | R2 |
| KHPNNIKRTFEGGVTMNGMFAMVEKYKKDGEKMLDTWTVEFGDPSLLVRTLVP         | TKMQVTAPZ             | R1 |
| *****   |                       |    |

Fig. 11- Alinhamento da estrutura primária da gingipain R1 e R2, onde se verificam as semelhanças não só na sequência como nos aminoácidos envolvidos na formação do local activo.

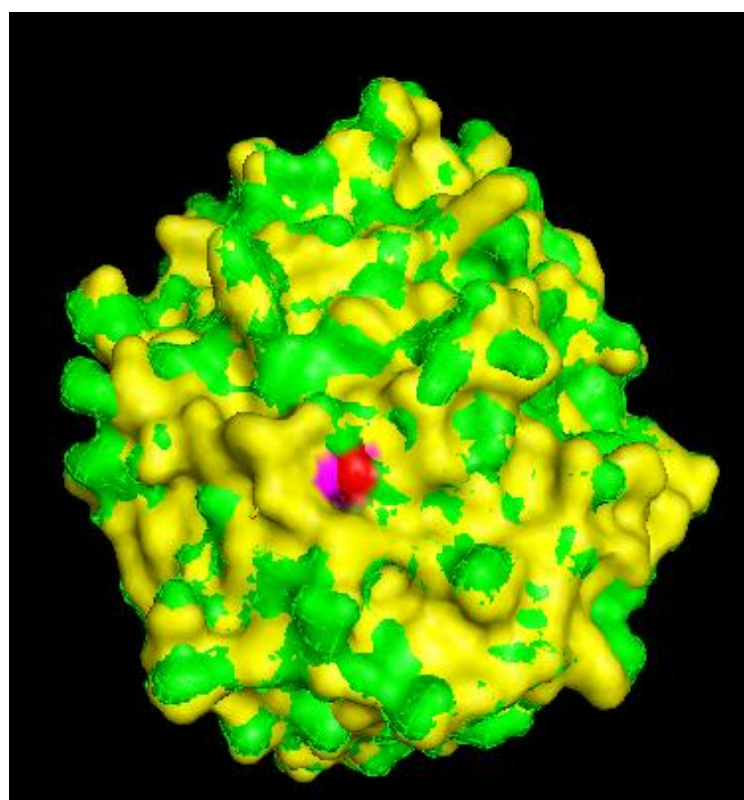


Fig. 12 – Sobreposição da representação tridimensional da superfície da estrutura da Gingipain R1 a amarelo e da Gingipain R2 a verde, com um alinhamento dos locais activos, respectivamente a roxo e a vermelho, anotado no programa Pymol.

Os resultados de Into e colaboradores (2006) indicam que vesículas com enzimas de *P. gingivalis* são competentes na inibição de SLPI. Como descrito na secção anterior, estes autores investigaram a digestão “in vitro” apenas de uma das várias proteases produzidas por *P. gingivalis*, a gingipain R1.

A enzima gingipain R2 de *P. gingivalis*, apresenta uma semelhança estrutural elevada com a R1 sendo que as duas enzimas diferem apenas no facto da R2

possuir um domínio de adesão/hemaglutinação mais pequeno (Fitzpatrick, Wijeyewickrema & Pike, 2009). As diferenças na especificidade destas duas enzimas são de tal forma reduzidas, que não parecem ser significativas (Ally *et al*, 2003).

Há outras proteases produzidas por *P. gingivalis* que podem estar incluídas nas vesículas obtidas de extractos de cultura de *P. gingivalis* estudados por Into e colaboradores (2006) e que contribuem também para a clivagem e inactivação de SLPI. Utilizámos o modelo do domínio 2 da SLPI, representado na figura 10, para identificar os possíveis locais de corte pela Gingipain K:

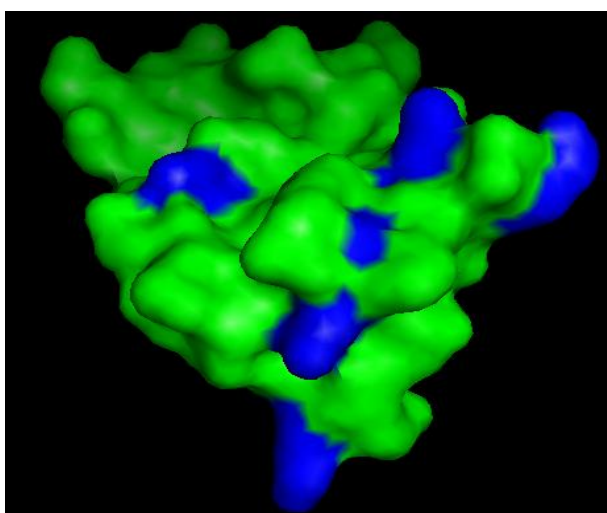


Figura 13 – Representação tridimensional da superfície da estrutura do domínio 2 de SLPI com indicação dos resíduos de lisina a azul, anotado no programa Pymol.

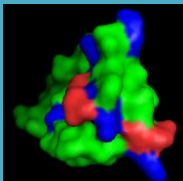

Dos seis resíduos de lisina presentes na estrutura do domínio 2 da SLPI, é evidente na representação da superfície que apenas 5 lisinas estão à superfície, sendo potenciais locais de corte da gingipainK. Não existe na literatura nenhum estudo descrevendo a digestão de SLPI pela gingipain K.

É assim sugerido que os baixos níveis de SLPI registados nas bolsas periodontais com doença activa (Into *et al*, 2006) podem ser devidos à degradação desta molécula pelas 3 gingipains produzidas por *P.gingivalis*.

Apesar de estes resíduos, quer de arginina, quer de lisina se encontrarem à superfície da molécula e portanto teoricamente disponíveis para o corte pelas gingipains, há que também ter em conta a estrutura secundária da SLPI, uma vez

que estruturas como hélices ou folhas indicam zonas onde o corte será menos provável. Assim, mostram-se na tabela V os resíduos de arginina e lisina à superfície da molécula de SLPI associados à estrutura secundária do fragmento em que estão inseridos:

Tabela V- tabela resumo dos resíduos à superfície da molécula da SLPI e respectiva estrutura secundária.

| Substrato   | Resíduos à superfície (Arg)                              | Locais de corte identificados | Resíduos à superfície (Lys)  |
|---|--|-------------------------------|--|
| SLPI<br> | SAQCLRYKKPE<br>CPGKKRCCPDT<br>PNPTRRKPGKC<br>DGQCKRDLKCC |                               | PTRRKPGKCPVTY<br>MDGQCKRDLKC<br> MGMCGKSCVSP<br>CVSPVKA |

As linhas pretas representam loops, ou seja, zonas da molécula em que não existe elementos de estrutura secundária definida e a seta representa a organização em folhas beta. O corte, pelas gingipains, será mais provável nas zonas de loop, pela “facilidade de acesso”. Daí que o resíduo de lisina na sequência MDGQCKRDLKC é o resíduo com menor probabilidade de ser o local de corte pela gingipain k.

### 3.2.1.2 Elafina:

A molécula da elafina apresenta 40% de homologia, na sequência primária, com a SLPI e os seus domínios funcionais de inibição são similares (Fitch *et al*, 2006; Williams, S *et al*, 2006). Essa semelhança está representada nas figuras 14 (estrutura primária), 15 e 16 (estrutura secundária).

O alinhamento obtido, através do programa Clustal W2, da estrutura primária do domínio 2 da SLPI e da elafina mostram a conservação de vários resíduos, principalmente no loop de interação responsável pela inibição das elastases (Moreau *et al*, 2008; Zani *et al*, 2008) em ambas as moléculas.



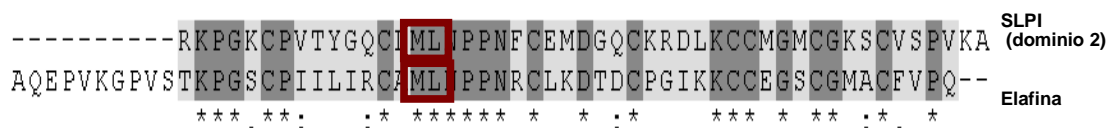


Figura 14- Alinhamento da estrutura primária do domínio 2 da SLPI e da elafina, utilizando o CLUSTAL W2. Os aminoácidos salientados com o retângulo vermelho compõem o loop de interação.

Além da conservação da estrutura primária, o alinhamento da estrutura tridimensional obtido pelo programa Pymol, construído com base nas estruturas cristalográficas depositadas nas bases de dados públicas, sugere que SLPI e elafina assumem uma conformação muito próxima.

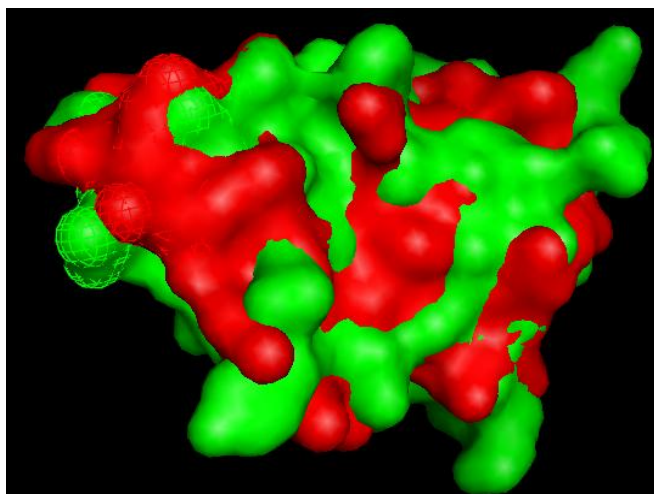


Figura 15- Alinhamento obtido do domínio 2 da SLPI (a vermelho) e da elafina (verde), anotado no programa Pymol.

A semelhança estrutural é também sugerida pela topologia gerada para estas moléculas (PDBsum) (Figura 16).

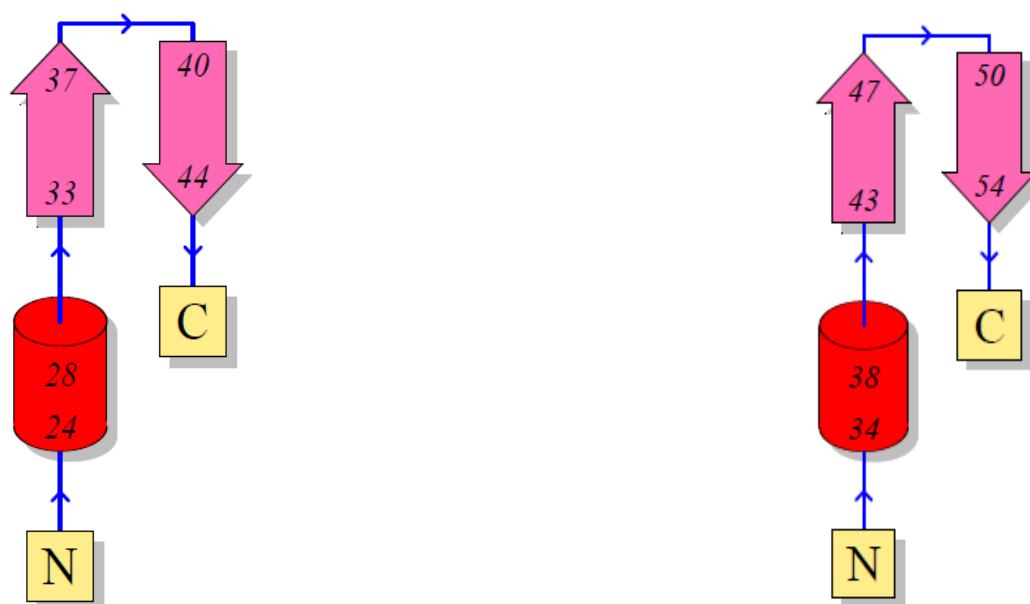


Figura 16- Topologia do domínio 2 da SLPI à esquerda e da elafina, à direita, geradas a pedido, através do site PDBsum ([www.ebi.ac.uk/pdbsum/](http://www.ebi.ac.uk/pdbsum/))

De acordo com os resultados da literatura e verificando as semelhanças estruturais entre estas duas moléculas, as gingipains R e K podem também estar envolvidas na degradação da elafina, tal como foi demonstrado experimentalmente por Kantyka *et al*, 2009, que identificaram os locais de corte da elafina (Fig. 17)

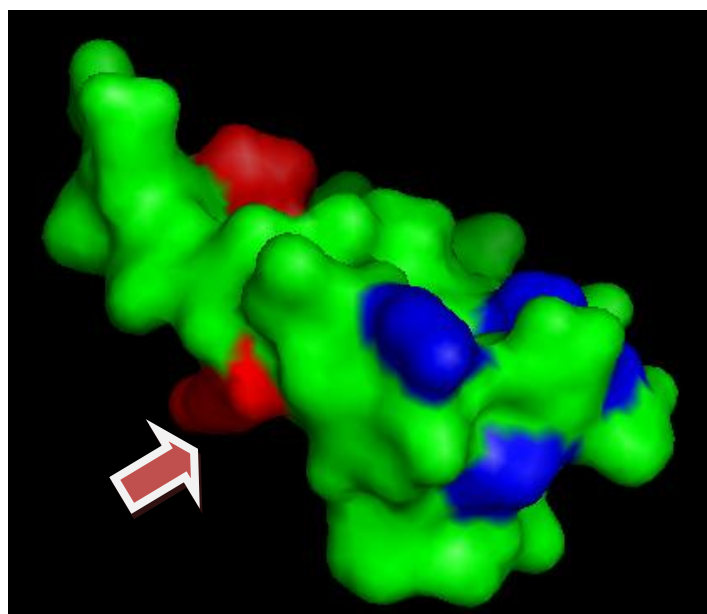
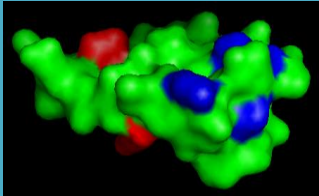




Figura 17- Representação da estrutura tridimensional da elafina salientando os resíduos de arginina (a vermelho) e de lisina (a azul) à superfície, com o auxílio do programa Pymol. Destacou-se o resíduo Arg 82, identificado por Kantyka *et al*, 2009 como o local de corte.

Tabela VI- tabela resumo dos resíduos à superfície da molécula da elafina e respectiva estrutura secundária.

| Substrato   | Resíduos à superfície (Arginina)  | Locais de corte identificados  | Resíduos à superfície (Lisina)           |
|---|---|--|--|
| <b>Elafina</b><br> | <br>IILIRCAMLN<br>NPPNRCLKDT |  IILIRCAMLN | CPGIKKCEGS<br>PNRCLKDTDCP<br>GPVSTKPGSCP |

A tabela VI mostra os resíduos de arginina e lisina à superfície da molécula da elafina. Todos estes resíduos se encontram em zona de “loops” e daí que sejam bons candidatos à clivagem pelas gingipains. O resultado experimental obtido por Kantyka *et al* (2009) está de acordo com um potencial local de corte identificado neste estudo.

### 3.2.2 Razões estruturais para a activação de metaloproteinases por gingipains

DeCarlo *et al* (1997), demonstraram a clivagem e consequente activação da pro-MMP-1 e pro-MMP-3 pelas gingipains, através de SDS-PAGE, Western Blot e sequenciação dos fragmentos obtidos. O corte, na pro-MMP-1, ocorre após o resíduo de lisina 66 e na pro-MMP-3 após o resíduo de arginina 37, o que indica que a gingipain K activará a pro-MMP-1 e as gingipain R1/R2 activarão a pro-MMP-3.

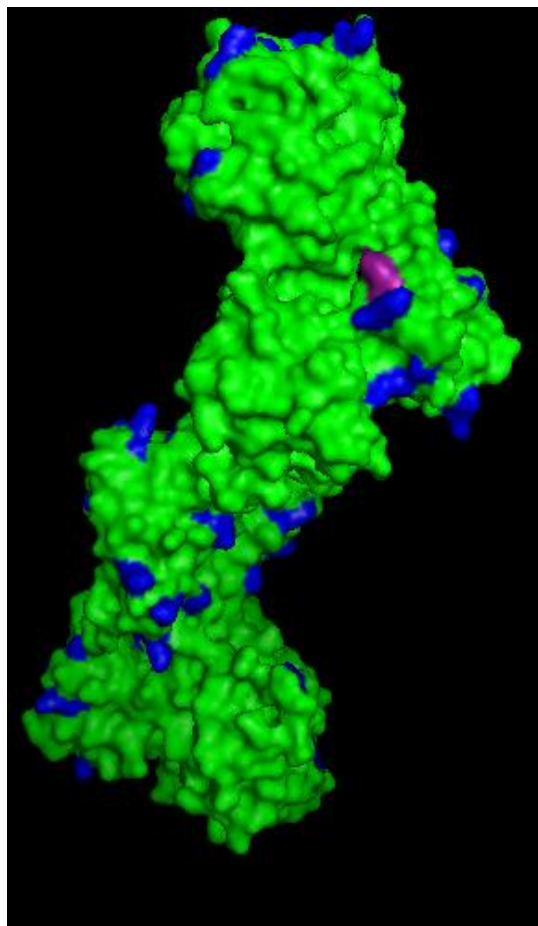


Figura 18 – Modelo de representação da estrutura 3D da pro-MMP-1, com indicação do resíduo de lisina 66 a roxo e os restantes resíduos de lisina à superfície a azul.

A figura 18 representa a estrutura cristalográfica da pro-MMP-1 (PDB-1SU3) (Jozic *et al*, 2005), onde está destacado o local de corte (a roxo), determinado por DeCarlo *et al* (1997). Este modelo tridimensional foi obtido a partir de dados de cristalografia e trabalhado no programa de análise de estruturas Pymol, onde estão destacados a azul as outras lisinas que se encontram à superfície da molécula.

O facto de ocorrer “in vitro” apenas o corte no resíduo Lys-66, poderá mostrar que após a clivagem neste ponto, a molécula fica activa.

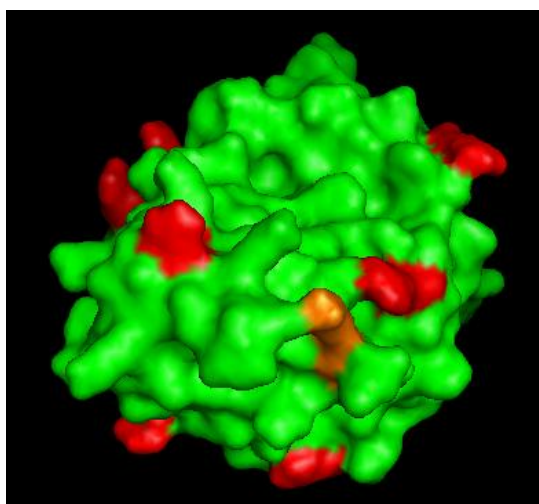


Figura 19 – Modelo de representação da estrutura 3D da pro-MMP-3 com indicação do resíduo de arginina 37 a laranja e os restantes resíduos de arginina à superfície a vermelho. Este modelo tridimensional foi trabalhado no programa de análise de estruturas Pymol.

A figura 19 mostra a estrutura da pro-MMP-3 determinada por Becker *et al* (1995), onde está destacado o local de corte a laranja, determinado por DeCarlo *et al* (1997). Posteriormente à clivagem neste resíduo pela gingipain R2, por um mecanismo autocatalítico, ocorre a completa activação da MMP-3.

Da mesma forma que na pro-MMP-1, a clivagem neste resíduo resulta na activação desta molécula.

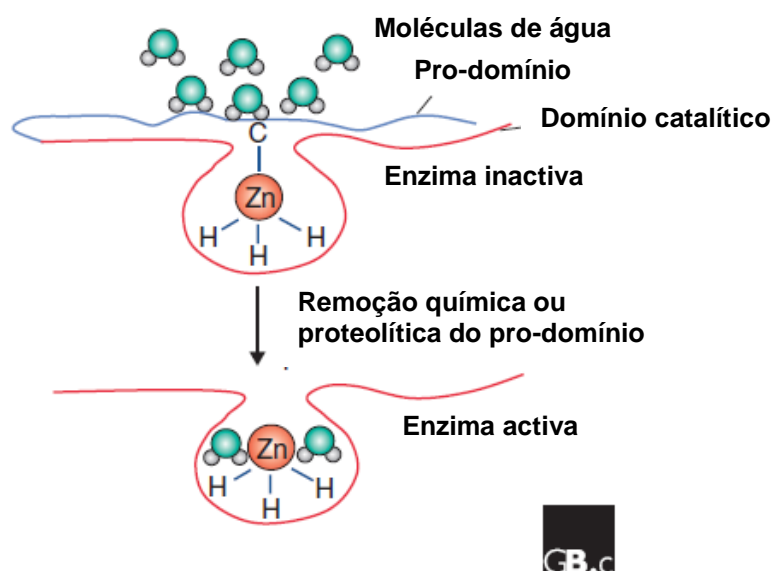
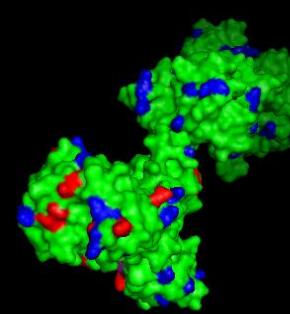
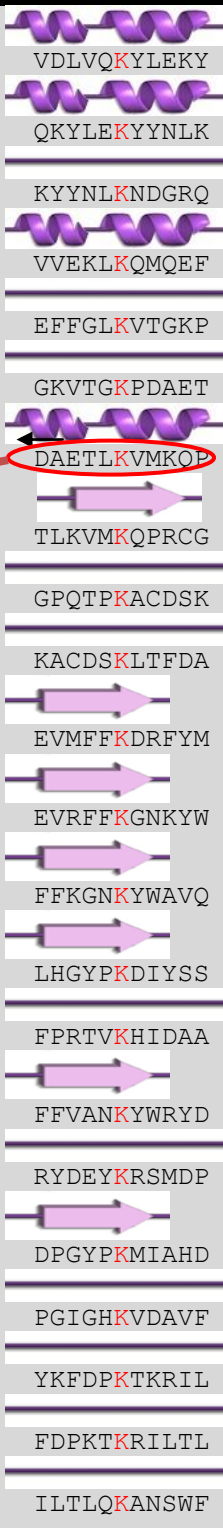


Figura 20- Esquema representativo da activação das MMP's. A remoção do pro-domínio, quer por proteólise, quer por alterações conformacionais da molécula, leva à activação da MMP, quando em contacto com as moléculas de água (Sommerville *et al*, 2003)

Tabela VII- tabela resumo dos resíduos à superfície da molécula da pro-MMP-1 e respectiva estrutura secundária

| Substrato | Resíduos à superfície (Arginina)   | Locais de corte identificados | Resíduos à superfície (Lisina)  |
|-----------|--|-------------------------------|---|
| ProMMP-1  | <br>DPKTKRILTLO<br>FFHGTREQYKFD<br>YDEYKRSMDPG<br>ANKYWRYDEYK<br>SFGFPRITVKHI<br>DRDEVRFKGN<br>YEFADRDEVRF<br>DRFYMRITNPFY<br>AITTIRGEVMF<br>EYNLHRVAAHE<br>WTNNFREYNLH<br>FDEDERWTNNF<br>VRGDHRDNSPF<br>MISFVRGDHRD<br>TPDLPRADVDH<br>THLTYRIENYT<br>TEGNPRWEQTH | DAETLKVMKQP                   | <br>VDLVQKYLEKY<br>QKYLEKYYNLK<br>KYYNLKNDGRQ<br>VVEKLKQMQUEF<br>EFFGLKVTGKP<br>GKVTGKPD AET<br>DAETLKVMKQP<br>TLKVMKQPRCG<br>GPQTPKACDSK<br>KACDSKLTFDA<br>EVMFFKDRFYM<br>EVRFFKGNKYW<br>FFKGNKYWAVQ<br>LHGYPKDIYSS<br>FPRTVKHIDAA<br>FFVAN KYWRYD<br>RYDEYKRSMDP<br>DPGYPKMIAHD<br>PGIGHKVD A VF<br>YKFDPKTKRIL<br>FDPKTKRILTL<br>ILTLQKANSWF |

Os resultados mostram que as gingipains têm como resíduo alvo uma lisina que se encontra inserida numa hélice. Para confirmar este dado, correu-se a sequência de aminoácidos no programa PSIPRED, disponível no site (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/psiform.html>) para obter mais dados sobre a estrutura secundária e obtiveram-se os resultados apresentados na figura seguinte:

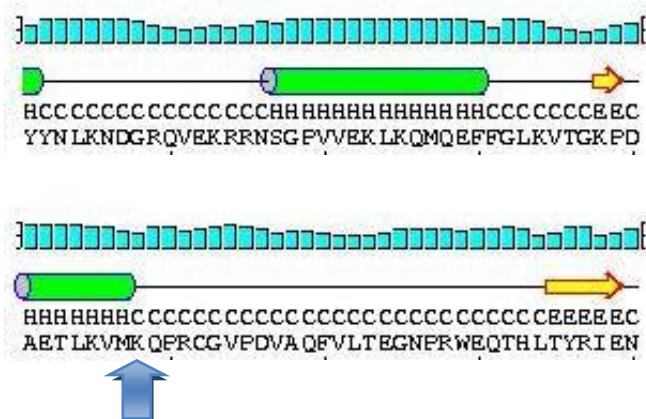


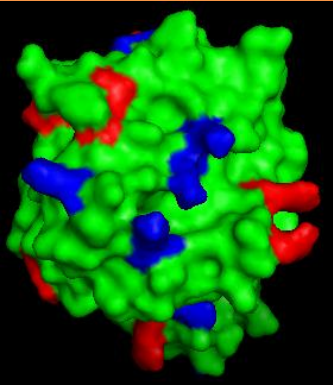
Figura 21- estrutura secundária da pro-MMP1, obtida com o programa PSIPRED. Os cilindros verdes representam hélices, as setas amarelas representam folhas betas e os traços negros simulam loops. A seta azul indica o resíduo de lisina onde ocorrerá o corte da pro-MMP 1 pela gingipain K.

O resíduo de lisina, nesta representação, encontra-se no final de uma hélice, na transição para um loop. O corte será mais provável se se tratar de uma hélice larga, que permita o acesso à gingipain.



Figura 22- Representação da sequência primária da pro-MMP 1, com indicação do resíduo onde cortará a gingipain k (seta preta) e o local habitual de corte e activação da pro-MMP 1 (seta vermelha).

Tabela VIII- tabela resumo dos resíduos à superfície da molécula da pro-MMP-3 e respectiva estrutura secundária

| Substrato  | Resíduos à superfície (Arginina)  | Locais de corte identificados       | Resíduos à superfície (Lisina)  |
|--|---|-------------------------------------|---|
| <b>ProMMP-3</b><br> | <div> <div>KQFVVRKDSGP</div> <div>VVKKI REMQKF</div> <div>TLEV MRKPRCG</div> <div>VMRKPRCGVPV</div> <div>DVGHF RTFPGI</div> <div>GIPKWRKTHLT</div> <div>PLTFS RLYEGE</div> <div>ISFAV REHGDF</div> <div>LTDLT RFRLSQ</div> <div>DLTRF RLSQDD</div> </div> | <div> <div>KQFVVRKDSGP</div> </div> | <div> <div>DEQWTKD TTGT</div> <div>VEKAL KVWEEV</div> <div>DSAVE KALKVW</div> <div>TPDLP KDAVDS</div> <div>IPKWR KTHLTY</div> <div>FPGIP KWRKTH</div> <div>LEV MRKPRCGV</div> <div>LEV TGKLDSDT</div> <div>I REMQ KFLGLE</div> <div>SGPVV KKIREM</div> <div>YYDLK KDVKQF</div> <div>MNLVQ KYLENY</div> </div> |

De acordo com os dados recolhidos, o local de corte determinado por DeCarlo *et al* (1997) para a pro-MMP 3 ocorrerá num resíduo inserido num loops, o que facilitará o acesso das gingipains.

YYDLKKDVKQFVRRKDSGPVVKKIREMQKFLGLEVTGKLDSDTLEV MRKPRCGVPDVGHFRTFPGIPKWR

Figura 23- Representação da sequência primária da pro-MMP 3, com indicação do resíduo onde cortará a gingipain k (seta preta) e o local habitual de corte e activação da pro-MMP 3 (seta vermelha)



### 3.2.3 Outras moléculas envolvidas nos sinais clínicos da Periodontite

#### 3.2.3.1 Osteoprotegerina

Um estudo de Yasuhara *et al* (2009), mostrou que a gingipain K degrada a OPG, contribuindo para um aumento da diferenciação dos osteoclastos e portanto contribuindo para a reabsorção óssea, um dos fenómenos clínicos observados na periodontite. A gingipain R2 não tem o mesmo efeito na diferenciação dos osteoclastos, o que pode ser explicada pela baixa degradação da OPG por esta protease (Yasuhara *et al*, 2009).

Como não está determinada ainda a estrutura cristalográfica desta molécula, utilizou-se a sequência de aminoácidos disponível no Uniprot Kb e o programa Modweb para fazer a determinação da estrutura tridimensional da molécula. Obtiveram-se dois modelos correspondentes a partes diferentes da molécula e como nos casos anteriores foram marcados os resíduos de lisina a azul e de arginina a vermelho.

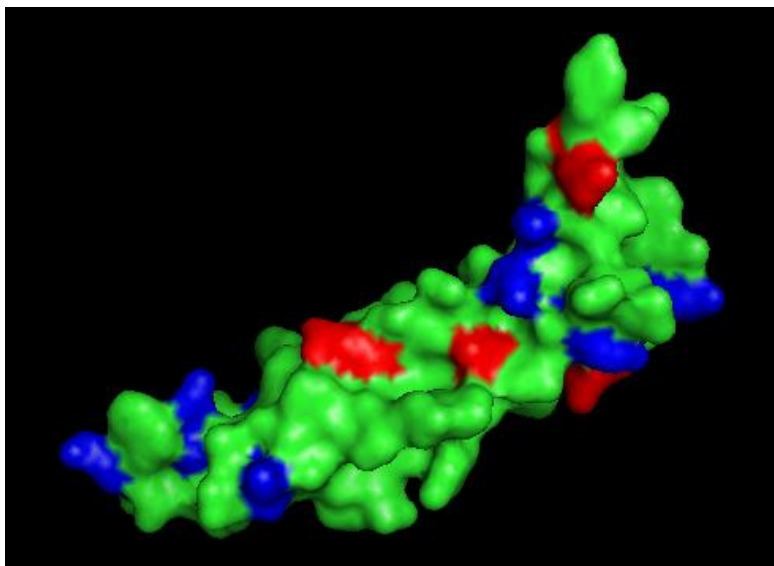


Figura 24 – Modelo de representação da estrutura 3D da OPG (resíduos 20-103), obtido com o programa Modweb, com indicação dos quatro resíduos de arginina a vermelho e oito de lisina a azul.

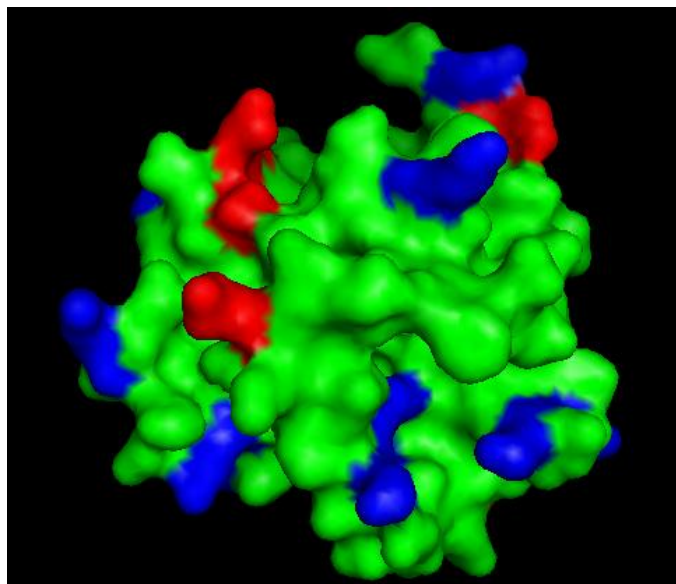
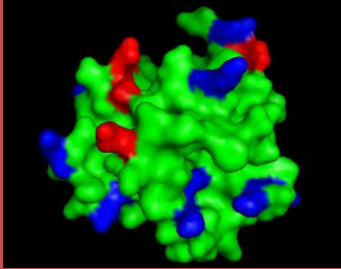
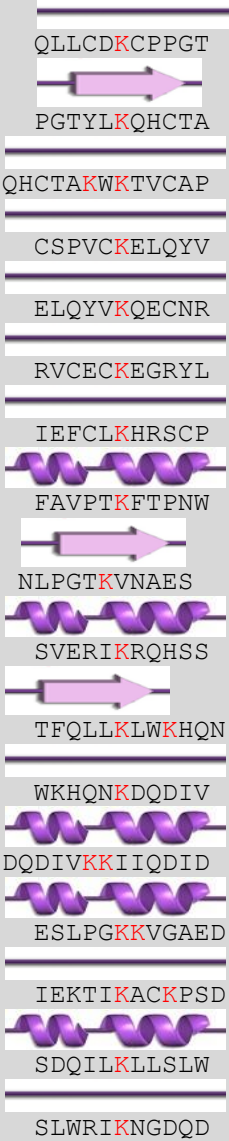


Figura 25 – Modelo de representação da estrutura 3D da OPG, (resíduos 192- 315), obtida com o programa Modweb com indicação dos 5 resíduos de arginina a vermelho e 13 de lisina a azul, à superfície.

Com base nestas duas representações, verifica-se que o número de resíduos de arginina à superfície da molécula são menos abundantes que os resíduos de lisina, o que poderá explicar a maior eficácia da gingipain K na sua degradação, relativamente à gingipain R2.

Tabela IX- Tabela resumo dos resíduos à superfície da molécula da OPG e respectiva estrutura secundária

| Substrato | Resíduos à superfície (Arginina)  | Locais de corte identificados | Resíduos à superfície (Lisina)   |
|-----------|---|-------------------------------|--|
| OPG       | <div>  </div> <div> FCLKH<b>R</b>SCPPG<br/> ECKEG<b>R</b>YLEIE<br/> KQECN<b>R</b>THN<b>R</b>VCEC<br/> AESVER<b>I</b>K<b>R</b>QHSS<br/> LLSLW<b>R</b>IKNGD<br/> TFEQL<b>R</b>SLMES<br/> ENSVQ<b>R</b>HIGHA </div> |                               | <div>  </div> <div> QLLCD<b>K</b>CPPGT<br/> PGTYL<b>K</b>QHCTA<br/> QHCTA<b>K</b>W<b>K</b>TVCAP<br/> CSPVC<b>K</b>ELQYV<br/> ELQYV<b>K</b>QECNR<br/> RVCEC<b>K</b>EGRYL<br/> IEFCL<b>K</b>HRSCP<br/> FAVPT<b>K</b>FTPNW<br/> NLPGT<b>K</b>VNAES<br/> SVERI<b>K</b>RQHSS<br/> TFQLL<b>K</b>LW<b>K</b>HQN<br/> WKHQN<b>K</b>DQDIV<br/> DQDIV<b>K</b>KIIQDID<br/> ESLPG<b>K</b>KVGAED<br/> IEKTI<b>K</b>ACK<b>K</b>PSD<br/> SDQIL<b>K</b>LLSLW<br/> SLWRI<b>K</b>NGDQD </div> |

Todos estes resíduos identificados à superfície são potenciais resíduos-alvo das gingipains, no entanto o corte será mais provável naqueles em que a estrutura secundária corresponde a um loop.



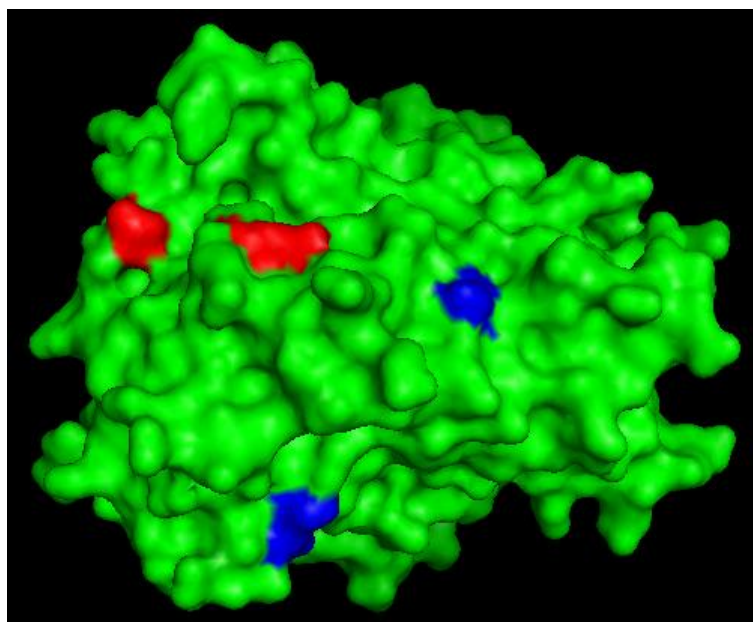
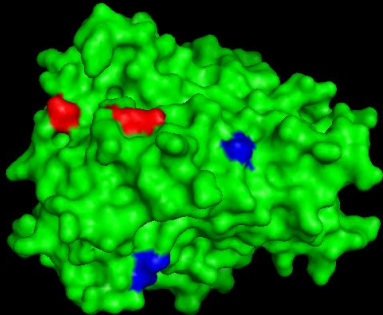

















Figura 27 -Estrutura cristalográfica (1TNF) da molécula TNF-alfa (Eck & Sprang, 1989) com indicação dos resíduos correspondentes aos locais de corte identificados por Calkins *et al*, 1998.  
Tabela X- tabela resumo dos resíduos à superfície da molécula do TNF-alfa e respectiva estrutura secundária.

| Substrato  | Resíduos à superfície (Arginina)  | Locais de corte identificados  | Resíduos à superfície (Lisina)  |
|--|---|--|---|
| <b>TNF-alfa</b><br> | <br>SAEIN <b>R</b> PDYLD |  | <br>VFQLF <b>K</b> GDRLS |
|  | <br>LEKGD <b>R</b> LSAEI |  | <br>EGAE <b>A</b> KPWYEP |
|  | <br>KSPC <b>Q</b> RETPEG |  | <br>LLSA <b>I</b> KSPCQR |
|  | <br>THTIS <b>R</b> IAVSY |  | <br>RTPSD <b>K</b> PVAHV |
|  | <br>NGVEL <b>R</b> DNQLV | <br>VSYQT <b>K</b> VNLLS | <br>VSYQT <b>K</b> VNLLS |
|  | <br>LQWLN <b>R</b> RANAL | <br>WLN <b>R</b> RANALL  |   |
|  | <br>AQAVV <b>R</b> SSSRT | <br>AQAVV <b>R</b> SSSRT |   |
|  |   |  |   |
|  |   |  |   |
|  |   |  |   |

Mais uma vez, os locais de corte localizam-se em loops, o que revela um grande potencial de corte, nestes locais.

### 3.2.3.3 Protrombina

Estudos de Imamura *et al* (2001), sugerem que as gingipains R estão envolvidas na activação da trombina, classificando-as como os mais potentes activadores de origem bacteriana, sendo mais eficaz a Gingipain R1 que a R2. Os locais de corte foram identificados, através de SDS-PAGE, Western Blot e sequenciação do N-terminal de cada fragmento obtido:

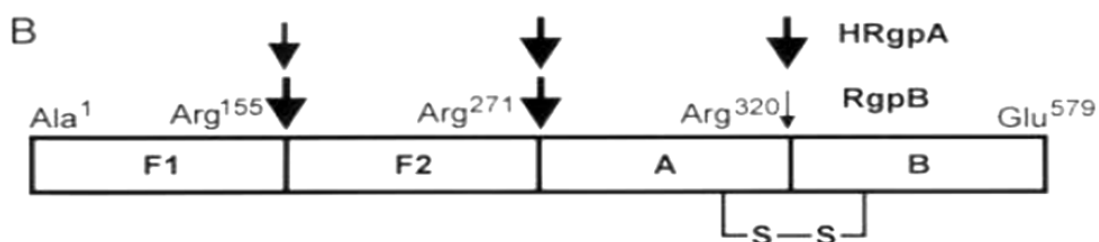


Figura 28- Locais de corte da protrombina determinados por Imamura *et al*, 2001 para as gingipains R1 (HRgpA) e gingipain R2 (RgpB).

A gingipain R1, corta no resíduo Arg 155, 271 e 320, enquanto a gingipain R2 cliva apenas nos resíduos 155 e 271, o que explica a diferença na eficácia de corte da protrombina.

Como não está determinada ainda a estrutura cristalográfica desta molécula, utilizou-se a sequência de aminoácidos disponível no Uniprot Kb e o programa Modweb para fazer a determinação da estrutura tridimensional da molécula. Obtiveram-se dois modelos diferentes, referentes a partes diferentes da molécula e como nos casos anteriores, foram marcados os resíduos de arginina a vermelho, com o auxílio do programa Pymol:

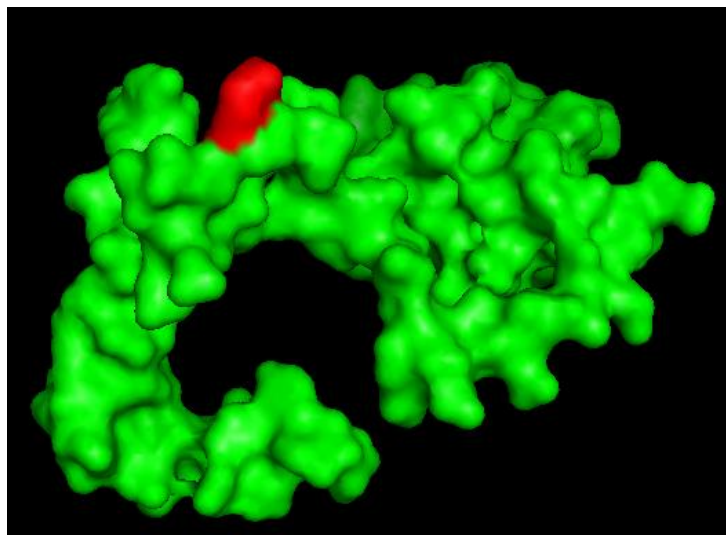


Figura 29 – Modelo de representação da estrutura 3D da protrombina (resíduos 169-318) com indicação do resíduo de arginina 271 a vermelho, local de corte das gingipains R1 e R2.

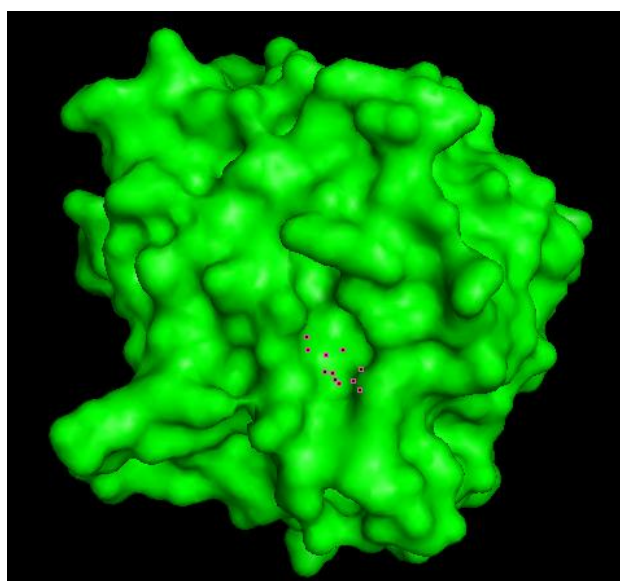
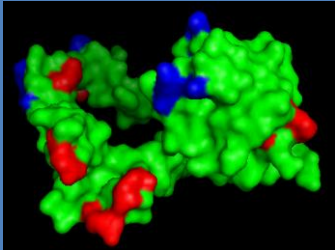





















Figura 30 – Modelo de representação da estrutura 3D da protrombina (resíduos 285-579). Verifica-se que, neste modelo, o resíduo 320 não se encontra à superfície da molécula e por isso não estará acessível ao corte pela gingipain R1. De salientar que se trata apenas de um modelo teórico, e que portanto poderá não representar a verdadeira estrutura desta molécula.

Tabela XI- tabela resumo dos resíduos à superfície da molécula do TNF-alfa e respectiva estrutura secundária.

| Substrato  | Resíduos à superfície (Arginina)   | Locais de corte identificados   | Resíduos à superfície (Lisina)   |
|--|--|---|--|
| <div>Protrombina</div>  | QCVPD <b>R</b> GQQYQ   | <div>RAIEG<b>R</b>TATSE</div> <p>O outro local de corte no aminoácido 363 não se encontra à superfície nos modelos obtido pelo MODWEB</p> |  ASAQA <b>K</b> ALSKH           |
|  | QQYQ <b>R</b> LAVTT  |   |  AKALS <b>K</b> HQDFN           |
|  | VENFC <b>R</b> NPDGD   |   | CYVAG <b>K</b> PGDFG   |
|  | DESD <b>R</b> AIEGR  |   |  RPLFE <b>K</b> KSLEDK          |
|  | <b>RAIEGRTATSE</b>   |   | KSLED <b>K</b> TEREL   |
|  | TFFNP <b>R</b> TFGSG   |   |  KKW <b>I</b> Q <b>K</b> VIDQF  |
|  | ADCGL <b>R</b> PLFEK   |   |  HVFRL <b>K</b> KW <b>I</b> QKV |
|  |  EDKTE <b>R</b> ELLES   |   | CDRDG <b>K</b> YGfYT   |
|  |  YTHVF <b>R</b> LKKWI   |   |  GPFVM <b>K</b> SPFNN           |
|  | GEGCD <b>R</b> DGKYG   |   | KPDEG <b>K</b> RGDAC   |
|  |  SPFNN <b>R</b> WYQMG |   | FCAGY <b>K</b> PDEGK   |
|  | PDEG <b>K</b> RGDACE   |   |  ERPVC <b>K</b> DSTRI         |
|  |  LPIVE <b>R</b> PVCKD |   | TANVG <b>K</b> GQPSV   |
|  | VCLPD <b>R</b> ETAAS   |   | GWGNL <b>K</b> ETWTA   |
|  |  PRYNW <b>R</b> ENLDR |   | LQAGY <b>K</b> GRVTG   |
|  |  RENLD <b>R</b> DIALM |   |  DIALM <b>K</b> LKKPV         |
|  | IYIHP <b>R</b> YNWRE   |   | ALMKL <b>K</b> KPVAF   |
|  | RTRYE <b>R</b> NIEKI   |   |  ISMLE <b>K</b> IYIHP         |
|  | KHSRT <b>R</b> YERNI   |   |  ERNIE <b>K</b> ISMLE         |
|  | IGKHS <b>R</b> TRYER   |   | LVRIG <b>K</b> HSRTR   |
|  |  SLISD <b>R</b> WVLTA |   | YPPWD <b>K</b> NFTEN   |
|  |  QVMLF <b>R</b> KSPQE |   | VMLFR <b>K</b> SPQEL   |
|  |  EDKTE <b>R</b> ELLES |   |  |



Da mesma forma, o resíduo envolvido na activação da protrombina encontra-se num loop e portanto acessível à acção das gingipains.

### **3.3 Modelos tridimensionais das proteases *PrtT* e *periodontain***

O facto de ter verificado que as gingipains podem interferir com processos celulares do hospedeiro de uma forma indirecta não só através de moléculas que podem ser consideradas efectoras como as elastases, mas também indirectamente através de moléculas inibidoras (SLPI e elafina), motivou a procura de outras proteases produzidas por *P. gingivalis* que pudessem ter um efeito semelhante. Assim, identificaram-se a *PrtT* e *periodontain* que estavam descritas como tendo como substrato a alfa 1 antitripsina. Estas proteases (*PrtT* e *periodontain*) não têm ainda a sua estrutura cristalográfica determinada. Até agora, os modelos estruturais eram obtidos por previsão usando como estrutura-base a streptopain. No entanto, a *periodontain* e a *PrtT* têm cerca de 800 aminoácidos, mais do dobro do tamanho da streptopain. Tendo sido recentemente determinada a estrutura cristalográfica da *interpain A* (Mallorqui-Fernandez *et al*, 2008) expressa por *Prevotella intermédia*, foi possível obter modelos diferentes desta protease, usando o programa Geno3D.

|             |   |     |
|-------------|---|-----|
| Periodont   | -----M K K S F L L A I V M L F G I A M Q G H S A P V T K E R-----   | 28  |
| PrtT        | -----M K R I F Y T L G L L L L C L P M L - Q A G P V T R S K-----   | 27  |
| Streptop    | -----M N K K K L G I R L L S L L A L G G F V L A N P V F A D Q N F A R N E K E  | 37  |
| Interpain A | M E K P S S K C S S F P I G Y S F F K H I Y M K I K Q N L F V A F V L L M L V P T F A W A K P R T K E Q-----M           | 53  |
|             | * : : : : * : : : : * : : : : * : : : :   |     |
| Periodont   | A L N L A R L A L R Q I S L R M G Q T A V S D K I S I D Y V Y R Q G D A E R G I T S Q E E G S P A Y F Y V A N R G N N E | 88  |
| PrtT        | A E Q T A K N F F A K R Q P T L S S S T A S -- L R M D F V Y K A A E R E E-----A L F F V F N R G E K D                  | 75  |
| Streptop    | A K D S A I T F I Q K S A A I K A G A R S A E D I K L D K V N L G G E L S G-----S N M Y V Y N I S T G-                  | 86  |
| Interpain A | K K T A A S A I N L Q T T L G K H K M N A P Q Q G G K R T V N Q L R E L K Q-----T H T Y T V F G Y T D G                 | 103 |
|             | * : : : : * : : : : * : : : : * : : : :   |     |
| Periodont   | G Y A L V A A D D R I P T I L A Y S P I G R F D M D S M P D N L R M W L Q I Y D Q E I G L I L S G K A R---L N E E I     | 145 |
| PrtT        | G F L L V A A D D R F P E V I G Y A F K G H F D A A R M P D N L R G W L K G Y E R E M L A V M D G K A E P I D P I R E A | 135 |
| Streptop    | G F V I V S G D K R S P E I L G Y S T S G S F D A N G K - E N I A S F M E S Y V E Q I K E N K K-----L                   | 134 |
| Interpain A | G F A V I S A D D L A P E L L G V S E S N F V E T D N P -- S F K W W L K A I D E V I T N A V K N N K P-----L            | 154 |
|             | * : : : : * : : : : * : : : : * : : : :   |     |
| Periodont   | L R T E G V P A E V H A L M D N G H F A N D P M R W N Q G Y P W N N K E P L L P-----N G N H A Y T G C V A               | 196 |
| PrtT        | K P T R D L P S S I A P I L E T G E H A S D P I L W D Q G Y P F N T L H P L L P-----S G Q Q A Y T G C V A               | 186 |
| Streptop    | D T T Y A G T A E I K Q P V V K S L L D S K G I H Y N Q G N P Y N L L T P V I E K V K P G E Q S F V G Q H A A T G C V A | 194 |
| Interpain A | S V I K P D P S K Y A A E V S T L L T T T --- W G Q Q M P Y N K L L P N T K-----K G R L I T G C V A                     | 200 |
|             | * : : : : * : : : : * : : : : * : : : :   |     |
| Periodont   | T A A A Q I M R Y H S W P L Q G E G S F D Y H A G S L V G N-----W S G T F G E M Y D W I N M P G N P D L D N L           | 249 |
| PrtT        | T A M G Q I M R H Y K W P E K A S G E Y D Y D D M T G T H T-----H Y S G T F G E T Y N W S K M P G N I S V G - I         | 240 |
| Streptop    | T A T A Q I M K Y H N Y P N K G L K D Y T Y T L S S N N P Y F N H P K N L F A A I S T R Q Y N W N N I L P T Y S G R - E | 253 |
| Interpain A | T A T A Q A L N Y F K Y P V R G I G S H T V H Y P A N D P S G --- V A I S A D F G N T T Y D W A N M K D D Y S G N - Y   | 256 |
|             | ** * : : : : * : : : : * : : : : * : : : :  |     |
| Periodont   | T Q S Q V D A Y A T L M R D V S A S V S M S F Y -- E N G S G T Y S V Y V V G A L R N N F R Y K R S L Q L H V R A L Y T  | 307 |
| PrtT        | S P E E V K A L S T F M R D V S F S V N M Q F A -- D F G S G T F S I F V E R A L R E T F H Y K K S L R Y I H R S L L P  | 298 |
| Streptop    | S N V Q K M A I S E L M A D V G I S V D M D Y G -- P S S G S A G S S R V Q R A L K E N F G Y N Q S V H Q I N R S D F S  | 311 |
| Interpain A | T E A E A N A V A T L M L H C G V A S E M Q Y G G P N E G S G A Y M T D C A A G L R T Y F G F T D - A E Y I T R A D Y T | 315 |

Figura 31- Alinhamento parcial da estrutura primária da periodontain, PrtT, streptopain e interpain A, com o auxílio do Clustal W2, disponibilizado no site Uniprot Kb. O alinhamento total encontra-se na figura 2 do anexo I.

No caso da periodontain, esta protease apresenta uma homologia de cerca de 37% com a streptopain e de 36% com a interpain A. Dessa forma, criaram-se modelos desta protease, com o Programa Geno 3D. Para a PrtT, criaram-se modelos usando também a streptopain e a interpain A como modelos, sabendo que esta apresenta uma homologia de 41% e 33%, respectivamente.

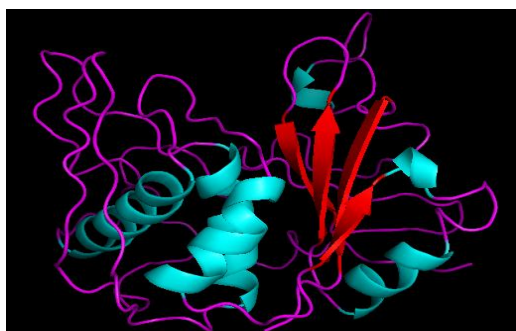


Figura 32- Modelo da estrutura secundária e terciária da periodontain, usando a estrutura da streptopain (PDB-2UZJ) como modelo.



Figura 33- Modelo tridimensional da estrutura secundária e terciária da periodontain, usando a estrutura da Interpain A (PDB-3BBA) como modelo.

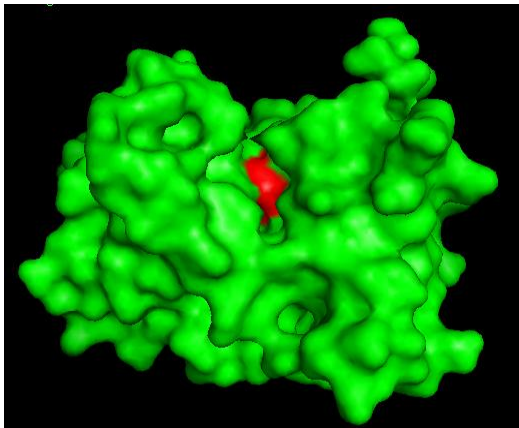


Figura 34- Modelo de representação da estrutura 3D, usando a estrutura da streptopain (PDB-2UZJ) como modelo, evidenciando o local activo Cys- 194, a vermelho.

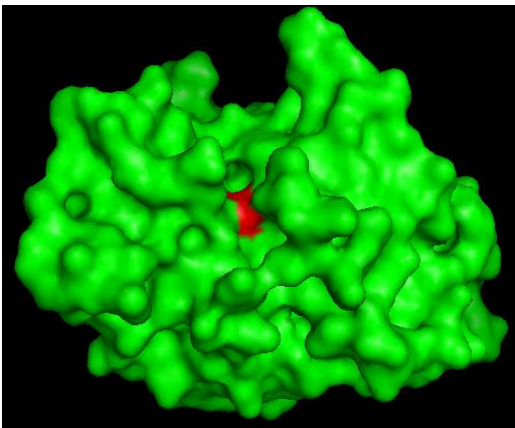


Figura 35- Modelo de representação da estrutura 3D, usando a estrutura da interpain A (PDB-3BBA) como modelo, evidenciando o local activo Cys- 194, a vermelho.

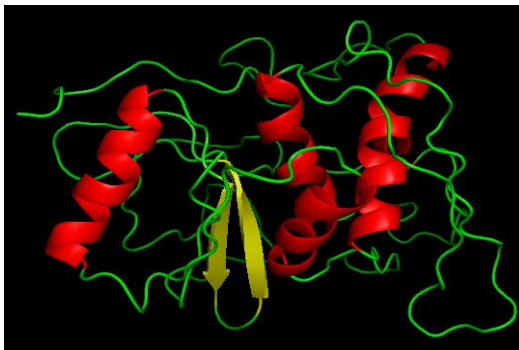


Figura 36- Modelo da estrutura secundária e terciária da PrtT, usando a estrutura da streptopain (PDB-2UZJ) como modelo.

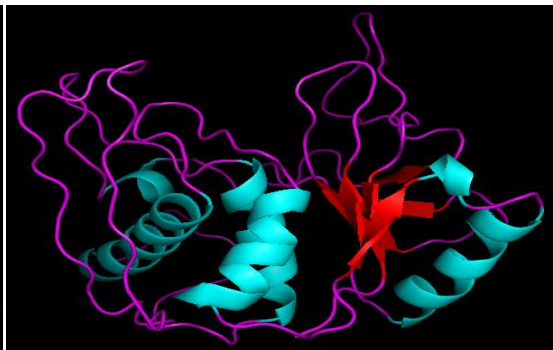


Figura 37- Modelo da estrutura secundária e terciária da PrtT, usando a estrutura da interpain A (PDB-3BBA) como estrutura base.

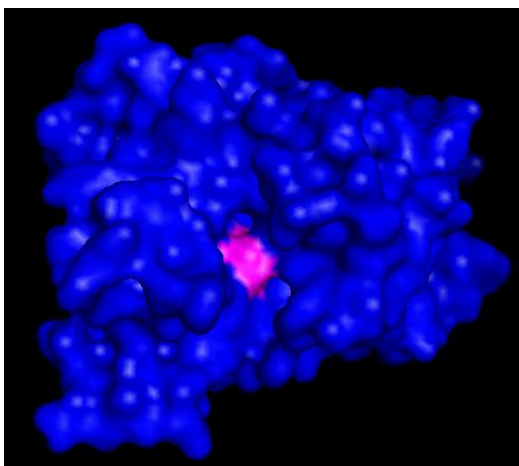


Figura 38- Modelo de representação da estrutura 3D, usando a estrutura da streptopain (PDB-2UZJ) como modelo, evidenciando o local activo Cys- 184, a rosa.

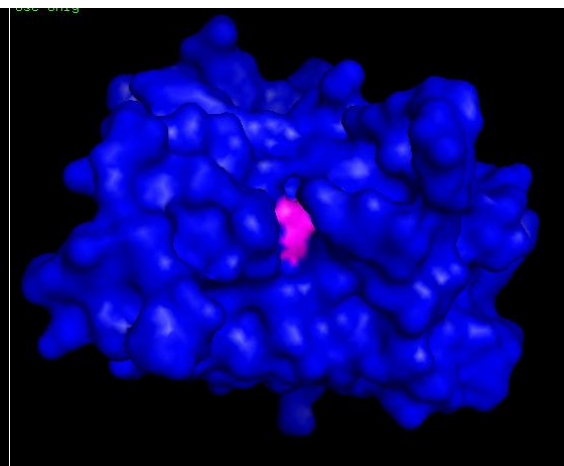


Figura 39- - Modelo de representação da estrutura 3D, usando a estrutura da interpain A (PDB-3BBA) como estrutura base, evidenciando o local activo Cys- 184, a rosa.

A demonstração de que a estrutura da PrtT e periodontain de *P. gingivalis* é idêntica à de interpain A leva-nos a propor que esta protease de *Prevotella intermedia* contribua para a clivagem do inibidor das elastases alfa 1 antitripsina e portanto crie sinergias com as gingipains para a alteração dos processos patológicos que ocorrem no periodonto.

## 4- Conclusões

O crescimento das bases de dados de proteínas e genomas tem disponibilizado uma vasta quantidade de informação que tem vindo a ser explorada. Essa informação é explorada utilizando ferramentas bioinformáticas que permitem comparação de sequências de diferentes moléculas e previsão das estruturas 3D das mesmas por algoritmos de modelação. Assim, surgem na literatura publicações em que são feitas inferências relativamente à estrutura, função e significado evolutivo de moléculas cuja existência se comprovou, mas que ainda não se encontram totalmente caracterizadas do ponto de vista bioquímico e biofísico (Pei & Grishin, 2009).

O objectivo deste trabalho foi identificar o detalhe molecular das interacções entre as gingipains e algumas das moléculas do hospedeiro que constituem o substrato destas proteases, relacionando essa interacção com os sinais clínicos da doença periodontal. Assim, da lista de substratos identificados nalguns artigos de revisão recentes (Fitzpatrick *et al*, 2009) foram seleccionadas proteínas que: tivessem a sua sequência e estrutura determinadas experimentalmente; não fossem membranares nem formassem complexos estáveis com outras moléculas; e finalmente que tivessem relevância para o desenvolvimento da doença periodontal. De uma primeira análise sobressaiu a Secretory Leucocyte Protease Inhibitor (SLPI). Esta molécula tinha sido identificada como substrato da gingipain R1, ficando inactivada após a clivagem (Into *et al*, 2006). A função primordial da SLPI é prevenir a lesão potencial dos tecidos, pela acção proteolítica de enzimas secretadas por células inflamatórias, como as elastases produzidas pelos neutrófilos, inibindo-as (Fitch *et al*, 2006, Williams *et al*, 2006). Para além disso, previne infecções virais e protege o hospedeiro de infecções bacterianas antagonizando componentes bacterianos como LPS, principalmente de *E.coli* e *S.aureus* e diminui a produção e restringe a actividade de metaloproteinases. Estes factos sugerem que a SLPI apresenta um papel importante na saúde periodontal (Into *et al*, 2006; Sullivan, *et al* 2008). Sugere-se neste estudo que, para além da gingipain R1, também a gingipain R2 faça a inactivação do SLPI, os dados que nos permitem esta conclusão resultam da verificação da homologia de sequência partilhada entre estas duas proteases (Figura 11 e 12). Não só as sequências são muito

idênticas, como os domínios funcionais identificados, nomeadamente os domínios de protease, são praticamente coincidentes (Tabela I e II do Anexo II). É ainda proposto o corte da SLPI pela gingipain K, uma vez que do estudo do modelo da SLPI foi possível verificar a presença de resíduos de lisina à superfície da molécula (Figura 13).

A acção conjunta das 3 gingipains de *P.gingivalis* sobre a SLPI (Figura 41) poderá explicar os baixos níveis de SLPI encontrados nas bolsas periodontais com doença activa (Into *et al*, 2006).

A comparação dos modelos disponíveis para a SLPI e a elafina levaram a confirmação de que as semelhanças estruturais descritas anteriormente entre estas duas moléculas (Moreau *et al*, 2008) se traduzem na “disponibilidade” de vários resíduos de arginina e lisina à superfície da molécula (fig. 14 a 17) o que levou a propor que a elafina seria um potencial substrato para as gingipains como foi confirmado experimentalmente por Kantyka *et al* (2009).

A clivagem destas moléculas (SLPI e elafina) inibidoras da acção das elastases, pelas gingipains R e K, terá repercussões no ecossistema periodontal, resultando na promoção da actividade das elastases produzidas pelos neutrófilos, com consequente destruição proteolítica do periodonto.

A conclusão de que as gingipains poderiam estar envolvidas na degradação dos inibidores naturais das elastases motivou a procura de outras proteases de *P.gingivalis* que pudessem ter um efeito semelhante. De acordo com a literatura existente, periodontain e PrtT (produzidas por *P. gingivalis*) clivam eficazmente a Alfa 1 antiproteínase (Otogoto & Kuramitsu, 1993, Curtis *et al*, 2001, Holt & Ebersole, 2005). A alfa1antiproteínase, ou alfa 1 antitripsina é o principal inibidor das proteases serínicas, foi isolada pela primeira vez em 1955 (Sachar *et al*, 1955). O seu nome deve-se à capacidade de inibição da tripsina. A maioria da alfa1antiproteínase é produzida no fígado, pelos hepatócitos e secretada para o plasma com uma semivida de 4,4 dias. Durante períodos de intensa inflamação, a sua concentração pode triplicar, fundamentalmente em resposta a citocinas como a IL-6 (Janciauskiene *et al*, 2007, Sullivan, *et al*, 2008). É actualmente claro que este inibidor tem actividade particular contra as elastases produzidas pelos neutrófilos, atingindo os 92% de inibição no plasma (Janciauskiene *et al*, 2007, Sullivan, *et al*, 2008). No sulco

gingival, a alfa 1 antiproteínase apresenta uma maior afinidade para as elastases que a SLPI, sendo portanto o principal inibidor das elastases (Cox *et al*, 2006).

No entanto, o facto de não haver determinação da estrutura cristalográfica nem da PrtT nem da periodontain levou-nos à procura de outras proteases com sequência idêntica, cuja estrutura tridimensional estivesse disponível. Foi assim que chegámos à identificação da interpain A como uma protease que partilha uma elevada homologia de sequência com PrtT e periodontain. A interpain A é uma protease de cisteína produzida por *Prevotella intermedia* uma bactéria com associação ao biofilme oral presente na doença periodontal. Assim a nossa proposta é que, tal como a PrtT e periodontain de *P. gingivalis*, também a interpain A de *Prevotella intermedia* seja capaz de degradar a alfa1 antitripsina e portanto impedir a inibição das elastases (Figura 40).

Neste trabalho foi ainda possível identificar um potencial local de corte das gingipains nas moléculas de pro-MMP1 e pro-MMP3, estes cortes correspondem a uma activação das moléculas de metaloproteinases que são responsáveis pela degradação de proteínas da matriz extracelular. Assim, as gingipains contribuem via activação das MMPs para a degradação do tecido periodontal e portanto para os sinais clínicos da periodontite, como mobilidade dentária (Figura 40).

Na figura 40 encontram-se sumariadas as conclusões deste trabalho em que a análise da estrutura de várias proteínas permitiu identificar relações entre proteases de origem microbiana e moléculas do hospedeiro que inibem a acção das elastases. A destruição das fibras que compõem o ligamento periodontal pelas elastases, levam à perda da força mecânica, contribuindo para o aparecimento de mobilidade dentária. Desta forma a acção conjunta das proteases de *P.gingivalis* (PrtT e periontain) e *Prevotella intermedia* (interpain A) contribuem para a degradação de um inibidor natural das elastases (alfa 1 antitripsina), tendo como consequência clínica a formação de bolsas periodontais com perda de inserção e consequente aumento da mobilidade dentária, o que culmina na perda do órgão dentário.



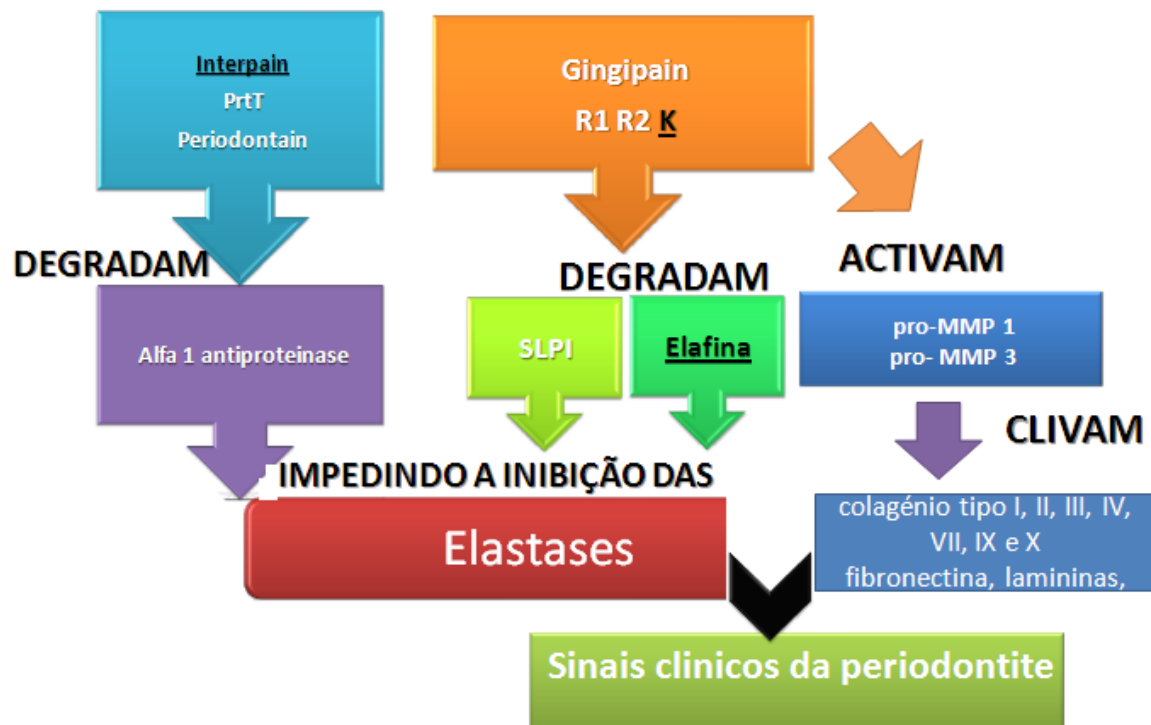


Figura 40- Modelo teórico da interação entre moléculas do hospedeiro e proteases microbianas. Neste estudo sugere-se a clivagem da alfa 1 antiproteínase pela interpaina A (a negro), a clivagem da SLPI pela gingipaina K (a negro) e ainda a clivagem da elafina (a negro), por todas as gingipainas. Neste trabalho as relações com as moléculas indicadas a negro são sugeridas pela primeira vez. Uma das sugestões (a clivagem da elafina pelas gingipainas) foi já comprovada experimentalmente (Kantyka *et al*, 2009)



## Bibliografia:

- Aduse-Opoku J, Davies NN, Gallagher A, Hashim A, Evans HE, Rangarajan M, Slaney JM, Curtis MA (2000) "Generation of lys-gingipain protease activity in *Porphyromonas gingivalis* W50 is independent of Arg-gingipain protease activities", *Microbiology*, 146, 1933-1940
- Ally N, Whisstock J, Sieprawska-Lupa M, Potempa J, Le Bonniec B, Travis J, Pike R (2003) "Characterization of Specificity of Arginine- Specific Gingipains from *Porphyromonas gingivalis* Reveals Active Site Differences between Different Forms of the Enzymes", *Biochemistry*, 42, 11693-11700
- Amano, A (2003) "Molecular Interaction of *Porphyromonas gingivalis* with Host Cells: Implications for the Microbial Pathogenesis of Periodontal Disease", *J Periodontol*, 74: 90-96
- Andrian E, Grenier D, Rouabhia M (2004) "In Vitro Models of Tissue Penetration and Destruction by *Porphyromonas gingivalis*", *Infection and Immunity*, p. 4689-4698
- Barrett AJ, Rawlings ND (1996) "Families and clans of cysteine peptidases", *Perspectives in Drug Discovery and Design*, Vol. 6, pp. 1-11
- Becker JW, Marcy AI, Rokosz LL, Axel MG, Burbaum JJ, Fitzgerald PM, Cameron PM, Esser CK, Hagmann WK, Hermes JD (1995) "Stromelysin-1: three-dimensional structure of the inhibited catalytic domain and of the C-truncated proenzyme", *Protein Sci*; 4(10):1966-76
- Bergstrom J, Eliasson S, Dock J (2000) "A 10-year prospective study of tobacco smoking and periodontal health", *J Periodontol*; 71(8):1338-1347
- Berman, Westbrook, Feng, Gilliland, Bhat, Weissig, Shindyalov, Bourne, The Protein Data Bank, *Nucleic Acids Research*, 28 pp. 235-242 (2000)
- Bialas A, Grembecka J, Krowarsch D, Otlewski J, Potempa J, Mucha A (2006) "Exploring the Sn Binding Pockets in Gingipains by Newly Developed Inhibitors: Structure-Based Design, Chemistry, and Activity", *J Med Chem*, 49, 1744-1753
- Bryson K, McGuffin LJ, Marsden RL, Ward JJ, Sodhi JS, Jones DT (2005) "Protein structure prediction servers at University College London", *Nucl. Acids Res.* 33(Web Server issue): W36-38.
- Buchmann R, Hasilik A, Nunn ME, Van Dyke TE, Lange DE (2002) "PMN responses in chronic periodontal disease: evaluation of gingival crevicular fluid enzymes and elastase-alpha-1-proteinase inhibitor complex", *J Clin Periodontol* 2002; 29: 563-572
- Buchmann R, Hasilik A, Van Dike T, Lange D (2002) "Amplified Crevicular Leukocyte Activity in Aggressive Periodontal Disease", *J Dent Res* 81 (10): 716-721
- Calkins CC, Platt K, Potempa J, Travis J (1998) "Inactivation of tumor necrosis factor-alpha by proteinases (gingipains) from the periodontal pathogen, *Porphyromonas gingivalis*. Implications of immune evasion", *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 273, no. 12, pp 6611-6614
- Carman RJ, Ramakrishnan MD, Harper FH (1990) "Hemin levels in culture medium of *Porphyromonas* (*Bacteroides*) *gingivalis* regulate both hemin binding and trypsinlike protease production", *Infect Immun*; 58(12):4016-9
- Chang A., S. M. (9 de Julho de 2009). BRENDA, Enzyme Database. Obtido em 12 de Setembro de 2009, de BRENDA, The Comprehensive Enzyme Information System.
- Cox S, Rodriguez-Gonzalez E, Booth V, Eley B (2006) "Secretory leukocyte protease inhibitor and its potential interactions with elastase and cathepsin B in gingival crevicular fluid and saliva from patients with chronic periodontitis", *J Periodont*, 41, 477- 485

- Curtis M, Aduse-Opoku J, Rangarajan M (2001) "Cysteine proteases of *Porphyromonas gingivalis*", *Crit Rev Oral Biol Med*, 12(3):192-216
- DeCarlo AA Jr, Windsor LJ, Bodden MK, Harber GJ, Birkedal-Hansen B, Birkedal-Hansen H (1997) "Activation and novel processing of matrix metalloproteinases by a thiol-proteinase from the oral anaerobe *Porphyromonas gingivalis*", *J Dent Res*; 76(6):1260-70
- Eck MJ, Sprang SR (1989) "The structure of tumor necrosis factor- $\alpha$  at 2.6 Å resolution. Implications for receptor binding", *J Biol Chem*; 264(29):17595-605
- Eichinger A, Beisel H, Jacob U, Huber R, Medrano F, Bandula A, Potempa J, Travis J, Bode W (1999) "Crystal structure of gingipain R: a Arg-specific bacterial cysteine proteinase with a caspase-like fold", *The EMBO Journal*, Vol. 18 No. 20, 5453-5462
- Fitch PM, Roghanian A, Howie SM, Sallenave JM (2006) "Human neutrophil elastase inhibitors in innate and adaptive immunity", *Biochemical Society Transactions*, Volume 34, part 2
- Fitzpatrick, R, Wijeyewickrema, L, Pike, R (2009) "The gingipains: scissors and glue of the periodontal pathogen, *Porphyromonas gingivalis*" *Future Microbiology* 4(4), 471-478
- Combet C, Jambon M, Deléage G & Geourjon C (2002) "Geno3D: Automatic comparative molecular modelling of protein" *Bioinformatics*, 18, 213-214
- Geurs NC, Lewis CE, Jeffcoat MK (2003) "Osteoporosis and periodontal disease progression" *Periodontol* 2000; 32:105-110
- Grenier D, Roy S, Chandad F, Plamondon P, Yoshioka M, Nakayama K, Mayrand D (2003) "Effect of Inactivation of the Arg- and/or Lys-Gingipain Gene on Selected Virulence and Physiological Properties of *Porphyromonas gingivalis*", *Infection and Immunity*, p.4742-4748
- Grossi SG, Zambon JJ, Ho AW, Koch G, Dunford RG, Machtei EE (1994) "Assessment of risk for periodontal disease. I. Risk indicators for attachment loss", *J Periodontol*; 65(3):260-267
- Guentsch, A, Puklo, M, Preshaw, PM, Glockmann, E, Pfister, W, Potempa, J, Eick, S (2009) "Neutrophils in chronic and aggressive periodontitis in interaction with *Porphyromonas gingivalis* and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*" *J Periodont Res*, 44(3):368-77
- Haake SK, Meyer DH, Fives Taylor PM, & Schenkein H (2006) "Periodontal Diseases" In R. J. Lamont, R. A. Burne, M. S. Lantz, & D. J. LeBlanc, *Oral Microbiology and Immunology* (pp. 253-294). Washington: ASM Press
- Harrel SK, Nunn ME (2001) "The effect of occlusal discrepancies on periodontitis. II. Relationship of occlusal treatment to the progression of periodontal disease", *J Periodontol*; 72(4):495-505
- Holt SC & Ebersole J (2005) "*Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola* and *Tannerella forsythia*: the 'red complex', a prototype polybacterial pathogenic consortium in periodontitis", *Periodontology* 2000, Vol. 38, 72-122
- Holt SC, Ebersole J, Felton J, Brunsvold M, Kornman KS (1988) "Implantation of *Bacteroides gingivalis* in nonhuman primates initiates progression of periodontitis" *Science*; 239(4835):55-7
- Holzhausen M, Spolidorio LC, Vergnolle N (2005) "Role of protease-activated receptor-2 in inflammation, and its possible implications as a putative mediator of periodontitis", *Mem Inst Oswaldo Cruz*; 100 Suppl 1:177-80.
- Hosotaki K, Imamura T, Potempa J, Kitamura N, Travis J (1999) "Activation of protein C by arginine-specific cysteine proteinases (gingipains-R) from *Porphyromonas gingivalis*", *Biol Chem*; 380(1):75-80

- Houle MA, Grenier D, Plamondon P, Nakayama K (2003) "The collagenase activity of *Porphyromonas gingivalis* is due to Arg-gingipain", *FEMS Microbiology Letters* 221, 181-185
- Imamura T, Banbula A, Pereira P, Travis J, Potempa J (2001) "Activation of Human Prothrombin by Arginine-specific Cysteine Proteinases (Gingipains R) from *Porphyromonas gingivalis*" *J Biol Chem.* 2001, 276(22):18984-91
- Into T, Inomata M, Kanno Y, Matsuyama T, Machigashira M, Izumi Y, Imamura T, Nakashima M, Noguchi T, Matsushita K (2006) "Arginine-specific gingipains from *Porphyromonas gingivalis* deprive protective functions of secretory leucocyte protease inhibitor in periodontal tissue", *Clinical and Experimental Immunology*, 145: 545–554
- Janciauskiene S, Nita I, Stevens T (2007) "Alpha1-antitrypsin, old dog, new tricks. Alpha1-antitrypsin exerts in vitro anti-inflammatory activity in human monocytes by elevating cAMP", *J Biol Chem* 23;282(12):8573-82
- Jensen et al. *Nucleic Acids Res.* 2009, 37(Database issue):D412-6
- Jozic D, Bourenkov G, Lim NH, Visse R, Nagase H, Bode W, Maskos K (2005) "X-ray structure of human proMMP-1: new insights into procollagenase activation and collagen binding", *J Biol Chem*; 280(10):9578-85
- Kantyka T, Latendorf T, Wiedow O, Bartels J, Gläser R, Dubin G, Schröder JM, Potempa J, Meyer-Hoffert U (2009) "Elafin is Specifically Inactivated by RgpB from *Porphyromonas Gingivalis* by Distinct Proteolytic Cleavage" *Biol Chem*, September
- Katz J, Yang QB, Zhang P, Potempa J, Travis J, Michalek SM, Balkovetz DF (2002) "Hydrolysis of Epithelial Junctional Proteins by *Porphyromonas gingivalis* Gingipains", *Infection and Immunity*, p. 2515-2518
- Kim JI, Lee CJ, Jin MS, Lee CH, Paik SG, Lee H, Lee JO (2005) "Crystal structure of CD14 and its implications for lipopolysaccharide signaling", *J Biol Chem*; 280(12):11347-51. Epub 2005 Jan 10
- Koizumi M, Fujino A, Fukushima K, Kamimura T, Takimoto-Kamimura M (2008) "Complex of human neutrophil elastase with 1/2SLPI", *J Synchrotron Radiat*;15(Pt 3):308-11
- Kuramitsu H, Yoneda M, Madden T (1995) "Proteases And Collagenases Of *Porphyromonas gingivalis*" *Adv Dent Res*
- Lamster I, Ahlo J (2007) "Analysis of Gingival Crevicular Fluid as Applied to the Diagnosis of Oral and Systemic Diseases", *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1098: 216–229
- Lang N & Bosshardt D (2005) "The Junctional Epithelium: from Health to Disease", *J Dent Res* 84(1):9-20
- Lindhe, J (2005) "Tratado de Periodontia e Implantologia Oral", Guanabara Koogan
- Loubakos A, Potempa J, Travis J, D'Andrea MR, Andrade-Gordon P, Santulli R, Mackie EJ, Pike RN (2001) "Arginine-Specific Protease from *Porphyromonas gingivalis* Activates Protease-Activated Receptors on Human Oral Epithelial Cells and Induces Interleukin-6 Secretion", *Infection and Immunity*, p. 5121-5130
- Madden TE, Clark VL & Kuramitsu HK (1995) "Revised sequence of the *Porphyromonas gingivalis* PrtT cysteine protease/hemagglutinin gene. Homology with streptococcal pyrogenic exotoxin B/streptococcal proteinase", *Infect Immun* 63, 238-247
- Madigan MT, M. J. (2003). *Brock Biology of Microorganisms*. Pearson Education.
- Mallorquí-Fernández N, Manandhar SP, Mallorquí-Fernández G, Usón I, Wawrzonek K, Kantyka T, Solà M, Thøgersen IB, Enghild JJ, Potempa J, Gomis-Rüth FX (2008) "A new autocatalytic activation mechanism for cysteine proteases revealed by *Prevotella intermedia* interpain A", *J Biol Chem*; 283(5):2871-82
- Marsh, P (2003) "Are dental diseases examples of ecological catastrophes?" *Microbiology*, 149, 279-294

- McAlister AD, Sroka A, Fitzpatrick RE, Quinsey NS, Travis J, Potempa J, Pike RN (2009) "Gingipain enzymes from *Porphyromonas gingivalis* preferentially bind immobilized extracellular proteins: a mechanism favouring colonization?", *J Periodont Res*, 44: 348-353
- McDermid AS, McKee AS, Marsh PD (1988) "Effect of environmental pH on enzyme activity and growth of *Bacteroides gingivalis* W50", *Infect Immun*; 56(5):1096-100
- Moreau T, Baranger K, Dadé S, Dallet-Choisy S, Guyot N, Zani ML (2008), "Multifaceted roles of human elafin and secretory leukocyte proteinase inhibitor (SLPI), two serine protease inhibitors of the chelonianin family", *Biochimie* 90, 284-295
- Naito M, Hirakawa H, Yamashita A, Ohara N, Shoji M, Yukitake H, Nakayama K, Toh H, Yoshimura F, Kuhara S, Hattori M, Hayashi T, Nakayama K (2008) "Determination of the genome sequence of *Porphyromonas gingivalis* strain ATCC 33277 and genomic comparison with strain W83 revealed extensive genome rearrangements in *P. gingivalis*", *DNA Res*;15(4):215-25. Epub 2008 Jun 3
- Narayanan, E. (12 de 09 de 2009). Obtido de MODWEB, A Server for Protein Structure Modeling.
- Nelson D, Potempa J, Kordula T, Travis J (1999) "Purification and characterization of a novel cysteine proteinase (Periodontain) from *Porphyromonas gingivalis*", *The Journal of Biological Chemistry*, Vol 274, no 18, April 30, pp.12245-12251
- Nelson KE, Fleischmann RD, DeBoy RT, Paulsen IT, Fouts DE, Eisen JA, Daugherty SC, Dodson RJ, Durkin AS, Gwinn M, Haft DH, Kolonay JF, Nelson WC, Mason T, Tallon L, Gray J, Granger D, Tettelin H, Dong H, Galvin JL, Duncan MJ, Dewhirst FE, Fraser CM (2003) "Complete genome sequence of the oral pathogenic Bacterium *porphyromonas gingivalis* strain W83", *J Bacteriol*;185(18):5591-601
- Newman, M G, Takei, H H, & Carranza, F A (2004) "Carranza/ Periodontia Clínica", Editora Nova Guanabara
- Nguyen K, Travis J, Potempa J (2007) "Does the importance of the C-terminal residues in the maturation of RgpB from *Porphyromonas gingivalis* reveal a novel mechanism for protein export in a subgroup of Gram-Negative bacteria?", *J Bacteriol*,189(3):833-43
- Nunn ME, Harrel SK (2001) "The effect of occlusal discrepancies on periodontitis. I. Relationship of initial occlusal discrepancies to initial clinical parameters", *J Periodontol*; 72(4):485-494
- Nunn, ME (2003) "Understanding the etiology of periodontitis: an overview of periodontal risk factors", *Periodontol* 2000; 32:11-23
- O'Brien-Simpson NM, Paolini RA, Hoffmann B, Slakeski N, Dashper SG, Reynolds EC (2001) "Role of RgpA, RgpB, and Kgp Proteinases in Virulence of *Porphyromonas gingivalis* W50 in a Murine Lesion Model", *Infection and Immunity*, p. 7527-7534
- Olczak T, Simpson W, Liu X, Genco CA (2004) "Iron and heme utilization in *Porphyromonas gingivalis*", *FEMS Microbiol Rev* ;29(1):119-44
- Otogoto, J & Kuramitsu, H (1993) "Isolation and Characterization of the *Porphyromonas gingivalis* prtT Gene, Coding for Protease Activity", *Infect Immun*; 61(1):117-23
- Page RC, Kornman KS (1997) "The pathogenesis of human periodontitis: an introduction", *Periodontol* 2000; 14:9-11
- Pei, J & Grishin, NV (2009) "Prediction of a caspase-like fold in *Tannerella forsythia* virulence factor PrtH", *Cell Cycle* 8:9, 1453-1455
- Percival RS, Marsh PD, Devine DA, Rangarajan M, Aduse-Opoku J, Shepherd P, Curtis MA (1999) "Effect of temperature on growth, hemagglutination, and protease activity of *Porphyromonas gingivalis*", *Infect Immun*; 67(4):1917-21
- Pertz O, Bozic D, Koch AW, Fauser C, Brancaccio A, Engel J (1999) "A new crystal structure, Ca<sup>2+</sup> dependence and mutational analysis reveal molecular details of E-cadherin homoassociation", *EMBO J*; 18(7):1738-47

- Pihlstrom BL, Michalowicz BS, Johnson NW (2005) "Periodontal diseases", *Lancet.*, 366(9499):1809-20
- Polak D, Wilensky A, Shapira L, Halabi A, Goldstein D, Weiss EI, Hour-Haddad Y (2009) "Mouse model of experimental periodontitis induced by Porphyromonas gingivalis/Fusobacterium nucleatum infection: bone loss and host response", *J Clin Periodontol*; 36(5):406-10
- Potempa J, Bandula A, Travis J (2000) "Role of bacterial proteinases in matrix destruction and modulation of host responses", *Periodontology* 2000, Vol. 24, 153-192
- Potempa J, Mikolajczyk-Pawlinska J, Brassell D, Nelson D, Thogersen I, Enghild J, Travis J (1998) "Comparative Properties of Two Cysteine Proteinases (Gingipains R), the Products of Two Related but Individual Genes of Porphyromonas gingivalis", *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 273, No. 34, pp 21648-21657
- Potempa J, Pike RN (2005) "Bacterial Peptidases", *Contrib Microbiol*;12:132-80
- Potempa J, Sroka A, Imamura T, Travis T (2003) "Gingipains, the Major Cysteine Proteinases and Virulence Factors Porphyromonas gingivalis: Structure, Function and Assembly Multidomain Protein Complexes" *Current Protein and Peptide Science*, 4, 397-407
- ProtSweep, 2DSweep and DomainSweep: protein analysis suite at DKFZ., del Val C., Ernst P., Falkenhahn M., Fladerer C., Glatting KH., Suhai S., and Hotz-Wagenblatt A. *Nucleic Acids Research*, 2007
- Rangarajan M, Hashim A, Aduse-Opoku J, Paramonov N, Hounsell EF, Curtis MA (2005) "Expression of Arg-Gingipain RgpB Is Required for Correct Glycosylation and Stability of Monomeric Arg-Gingipain RgpA from Porphyromonas gingivalis W50, Infection and Immunity, p. 4864-4878
- Rawlings, N.D., Morton, F.R., Kok, C.Y., Kong, J. & Barrett, A.J. (2008) MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Res* 36, D320-D325
- Robinson PG, Boulter A, Birnbaum W, Johnson NW (2000) "A controlled study of relative periodontal attachment loss in people with HIV infection", *J Clin Periodontol*; 27(4):273-276
- Sato K, Sakai E, Veith P, Shoji M, Kikuchi Y, Yukitake H, Ohara N, Naito M, Okamoto K, Reynolds E, Nakayama K (2005) "Identification of a new Membrane-associated Protein That Influences Transport/Maturation of Gingipains and Adhesins of Porphyromonas gingivalis", *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 280, No. 10, pp 8668-8677
- Seers CA, Slakeski N, Veith PD, Nikolof T, Chen YY, Dashper SG, Reynolds EC (2006) "The RgpB C-terminal domain has a role in attachment of RgpB to the outer membrane and belongs to a novel C-terminal-domain family found in Porphyromonas gingivalis" *J Bacteriol*, 188(17):6376-86
- Sheets S, Robles-Price A, McKenzie RM, Casiano CA, Fletcher HM (2008) "Gingipain-dependent interactions with the host are important for survival of Porphyromonas gingivalis", *Frontiers in Bioscience* 13, 3215-3238
- Sheets SM, Potempa J, Travis J, Fletcher HM, Casiano CA (2006) "Gingipains from Porphyromonas gingivalis W83 Synergistically Disrupt Endothelial Cell Adhesion and Can Induce Caspase-Independent Apoptosis", *Infection and Immunity*, p. 5667-5678
- Smalley JW, Birss AJ, McKee AS, Marsh PD (1996) "Haemin binding as a factor in the virulence of Porphyromonas gingivalis", *FEMS Microbiol Lett*; 141(1):65-70
- Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL Jr. (1998) "Microbial complexes in subgingival plaque", *J Clin Periodontol*;25(2):134-44
- 
- Stathopoulou PG, Benakanakere MR, Galicia JC, Kinane DF (2009) "The host cytokine response to Porphyromonas gingivalis is modified by gingipains", *Oral Microbial Immunology*, 24 : 11-17

- Sullivan AL, Dafforn T, Hiemstra PS, Stockley RA (2008) "Neutrophil elastase reduces secretion of secretory leukoprotease inhibitor (SLPI) by lung epithelial cells: role of charge of the proteinase-inhibitor complex", *Respiratory Research*, 9: 60
- Tada H, Sugawara S, Nemoto E, Takahashi N, Imamura T, Potempa J, Travis J, Schimauchi H, Takada H (2002) "Proteolysis of CD14 on human gingival fibroblasts by arginine-specific cysteine proteinases from *Porphyromonas gingivalis* leading to down-regulation of lipopolysaccharide-induced interleukin-8 production", *Infect Immun*, 70(6):3304-7
- Takii R, Kadowaki T, Baba A, Tsukuba T, Yamamoto K (2005), "A Functional Virulence Complex Composed of Gingipains, Adhesins, and Lipopolysaccharide Shows High Affinity to Host Cells and Matrix Proteins and Escapes Recognition by Host Immune Systems", *Infection and Immunity*, p. 883-893
- Tamura K, Shan WS, Hendrickson WA, Colman DR, Shapiro L (1998) "Structure-function analysis of cell adhesion by neural (N-) cadherin", *Neuron*; 20(6):1153-63
- The UniProt Consortium, The Universal Protein Resource (UniProt), *Nucleic Acids Res.* 37:D169-D174(2009)
- Ujiie Y, Oida S, Gomi K, Arai T, Fukae M (2007) "Neutrophil elastase is involved in the initial destruction of human periodontal ligament", *J Periodont Res* 2007; 42: 325–330
- Ujiie Y, Shimada A, Komatsu K, Gomi K, Oida S, Arai T, Fukae M (2008) "Degradation of noncollagenous components by neutrophil elastase reduces the mechanical strength of rat periodontal ligament", *J Periodont Res* 2008; 43: 22–31
- Umemoto T, Yoshimura F, Kureshiro H, Hayashi J, Noguchi T, Ogawa T (1999) "Fimbria-mediated coaggregation between human oral anaerobes *Treponema medium* and *Porphyromonas gingivalis*", *Microbiol Immunol*;43 (9):837-45
- Urnoway S, Ansai T, Bitko V, Nakayama K, Takehara T, Barik S (2006) "Temporal activation of anti- and pro- apoptotic factors in human gingival fibroblasts infected with the periodontal pathogen, *Porphyromonas gingivalis*: potencial role of bacterial proteases in host signalling", *BMC Microbiology*, 6:26
- Williams SE, Brown TI, Roghanian A, Sallenave JM (2006), "SLPI and elafin: one glove, many fingers", *Clinical Science*,110, 21–35
- Wingrovet JA, DiScipio RG, Chen Z, Potempa J, Travis J, Hugli TE (1992) "Activation of Complement Components C3 and C5 by a Cysteine Proteinase (Gingipain-1) from *Porphyromonas (Bacteroides) gingivalis*", *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 267, No. 26, pp. 18902-18907
- Ximénez-Fyvie LA, Haffajee AD, Socransky SS (2000) "Microbial composition of supra- and subgingival plaque in subjects with adult periodontitis", *J Clin Periodontol*; 27(10):722-32
- Yasuhara R, Miyamoto Y, Takami M, Imamura T, Potempa J, Yoshimura K, Kamijo R (2009) "Lysine-specific gingipain promotes lipopolysaccharide and active vitamin D3-induced osteoclast differentiation by degrading osteoprotegerin" *Biochemical Journal*, 419(1):159-66
- Yilmaz O (2008) "The chronicles of *Porphyromonas gingivalis*: the microbium, the human oral epithelium and their interplay", *Microbiology*, 154, 2897-2903
- Yun PW, Decarlo AA, Hunter N (1999) "Modulation of Major Histocompatibility Complex Protein Expressiof by Human Gamma Interferon Mediated by Cisteine Proteinase-Adhesin Polyproteins of *Porphyromonas gingivalis*", *Infection and Immunity*, p. 2986-2995
- Sachar LA, Winter KK, Sicher N, Frankel S (1955) "Photometric method for estimation of elastase activity", *Proc Soc Exp Biol Med*, 90(2):323-6.



## Anexo I

### 1. Alinhamento das várias sequências de gingipains

|   |  |     |
|---|--|-----|
| W50   | -MKNLNKFVSIALCSSLLGGMAFAQQTELGRNPNVRLLESTQQSVT--KVQFRMDNLKFT   | 57  |
| H66   | -MKNLNKFVSIALCSSLLGGMAFAQQTELGRNPNVRLLESTQQSVT--KVQFRMDNLKFT   | 57  |
| 381   | -MKNLNKFVSIALCSSLLGGMAFAQQTELGRNPNVRLLESTQQSVT--KVQFRMDNLKFT   | 57  |
| W50   | -----MAFAQQTELGRNPNVRLLESTQQSVT--KVQFRMDNLKFT                  | 38  |
| W83   | -MKNLNKFVSIALCSSLLGGMAFAQQTELGRNPNVRLLESTQQSVT--KVQFRMDNLKFT   | 57  |
| 381   | MHPSTMRCMHLRPVTMHPTSRMLCWKRRLRPK-GVRSPEAIRGRIQGTWRQKTVDLPAGT   | 59  |
| : . : * : * * * : : : * : *                     |  |     |
| W50   | EVQTPKGIGQVPTYTEG--VNLSEKGMPTLPILSRSLAVSDTREMKVEVVSSKFIEKKNV   | 115 |
| H66   | EVQTPKGMAQVPTYTEG--VNLSEKGMPTLPILSRSLAVSDTREMKVEVVSSKFIEKKNV   | 115 |
| 381   | EVQTPKGMAQVPTYTEG--VNLSEKGMPTLPILSRSLAVSDTREMKVEVVSSKFIEKKNV   | 115 |
| W50   | EVQTPKGMAQVPTYTEG--VNLSEKGMPTLPILSRSLAVSDTREMKVEVVSSKFIEKKNV   | 96  |
| W83   | EVQTPKGIGQVPTYTEG--VNLSEKGMPTLPILSRSLAVSDTREMKVEVVSSKFIEKKNV   | 115 |
| 381   | EICCFPSLPKAPICSTSTLMRLRSKTNAKRADFTETFESSHGEAPAEWTTIDADGDGQG    | 119 |
| * : : : * : . : * * . . . : : : * * * : . : . : |  |     |
| W50   | LIAPSKGMIMRNEDPKKIPYVYGKSYSQNKFFPGEIATLDDPFILRDVRGQVVNFAPLQY   | 175 |
| H66   | LIAPSKGMIMRNEDPKKIPYVYGKSYSQNKFFPGEIATLDDPFILRDVRGQVVNFAPLQY   | 175 |
| 381   | LIAPSKGMIMRNEDPKKIPYVYGKSYSQNKFFPGEIATLDDPFILRDVRGQVVNFAPLQY   | 175 |
| W50   | LIAPSKGMIMRNEDPKKIPYVYGKSYSQNKFFPGEIATLDDPFILRDVRGQVVNFAPLQY   | 156 |
| W83   | LIAPSKGMIMRNEDPKKIPYVYGKSYSQNKFFPGEIATLDDPFILRDVRGQVVNFAPLQY   | 175 |
| 381   | WLCLSSGQLDWLTAHGGTNVVS--SFSWN---GMALNPDNYLISKDVTGATK----VKY    | 169 |
| : . * . * : : * : * * : : * : * : * * * : : *   |  |     |
| W50   | NPVTKTLRIYTEITVAVSET-SEQGKNILNKKGTFAGFEDTYKRMFMNYPEGRYTEPVEEK  | 234 |
| H66   | NPVTKTLRIYTEITVAVSET-SEQGKNILNKKGTFAGFEDTYKRMFMNYPEGRYTEPVEEK  | 234 |
| 381   | NPVTKTLRIYTEITVAVSET-SEQGKNILNKKGTFAGFEDTYKRMFMNYPEGRYTEPVEEK  | 234 |
| W50   | NPVTKTLRIYTEITVAVSET-SEQGKNILNKKGTFAGFEDTYKRMFMNYPEGRYTEPVEEK  | 215 |
| W83   | NPVTKTLRIYTEITVAVSET-SEQGKNILNKKGTFAGFEDTYKRMFMNYPEGRYTEPVEEK  | 234 |
| 381   | YYAVNDGFPGDHYAVMISKTGTNAGDFTVVFEETPNGINKGARFGLSTEADGAKPQSVW    | 229 |
| : . : * : * * : : * : : * : : * : : * : : *     |  |     |
| W50   | QNGRMIVIVAKKYEGLDKDFVDWKNQRLRTEVKVAEDIASPVATANAIQQFVKQYEYEKEG  | 294 |
| H66   | QNGRMIVIVAKKYEGLDKDFVDWKNQRLRTEVKVAEDIASPVATANAIQQFVKQYEYEKEG  | 294 |
| 381   | QNGRMIVIVAKKYEGLDKDFVDWKNQRLRTEVKVAEDIASPVATANAIQQFVKQYEYEKEG  | 294 |
| W50   | QNGRMIVIVAKKYEGLDKDFVDWKNQRLRTEVKVAEDIASPVATANAIQQFVKQYEYEKEG  | 275 |
| W83   | QNGRMIVIVAKKYEGLDKDFVDWKNQRLRTEVKVAEDIASPVATANAIQQFVKQYEYEKEG  | 294 |
| 381   | IERTVDLPAGTKYV-AFRHYNCSDLNYILLDDIQFTMGGSPTPTDYTYTVYRDGTKIKEG   | 288 |
| : : : * : * : : * : : : : * : : : * : * * *     |  |     |
| W50   | NDLTYV----LLVGDHK-DIPAKITPGIKSDQVYGQIVGNDHYNEVFIGRFSCESKEDLK   | 349 |
| H66   | NDLTYV----LLVGDHK-DIPAKITPGIKSDQVYGQIVGNDHYNEVFIGRFSCESKEDLK   | 349 |
| 381   | NDLTYV----LLVGDHK-DIPAKITPGIKSDQVYGQIVGNDHYNEVFIGRFSCESKEDLK   | 349 |
| W50   | NDLTYV----LLVGDHK-DIPAKITPGIKSDQVYGQIVGNDHYNEVFIGRFSCESKEDLK   | 330 |
| W83   | NDLTYV----LLVGDHK-DIPAKITPGIKSDQVYGQIVGNDHYNEVFIGRFSCESKEDLK   | 349 |
| 381   | LTETTFEEDGVATGNHEYCEVVKYTAGVSPKKCVNVTVNSTQFNPVKNLKAQPDG-GDVV   | 347 |
| * . : * : * : * * * : : * : : * : : * : : *     |  |     |
| W50   | TQIDRTIHYERNITTEDKWLGQALCIASAEGGPSADNGESDIQHENVIANLLTQYGYTKI   | 409 |
| H66   | TQIDRTIHYERNITTEDKWLGQALCIASAEGGPSADNGESDIQHENVIANLLTQYGYTKI   | 409 |
| 381   | TQIDRTIHYERNITTEDKWLGQALCIASAEGGPSADNGESDIQHENVIANLLTQYGYTKI   | 409 |
| W50   | TQIDRTIHYERNITTEDKWLGQALCIASAEGGPSADNGESDIQHENVIANLLTQYGYTKI   | 390 |
| W83   | TQIDRTIHYERNITTEDKWLGQALCIASAEGGPSADNGESDIQHENVIANLLTQYGYTKI   | 409 |
| 381   | LKWEAPSAKKTEGSREVKRIGDGLFVTIEPANDVRANEAKVVLAADNVWGDNTGYQFLLD   | 407 |
| : : . : : * * : * * : : . . * : : : * * :       |  |     |
| W50   | IKCYDPGVTPKNIIDAFNGGISLVNYTGHGSETAWGTSHFGTTHVKQLTNSNQLPFIFDV   | 469 |
| H66   | IKCYDPGVTPKNIIDAFNGGISLVNYTGHGSETAWGTSHFGTTHVKQLTNSNQLPFIFDV   | 469 |
| 381   | IKCYDPGVTPKNIIDAFNGGISLVNYTGHGSETAWGTSHFGTTHVKQLTNSNQLPFIFDV   | 469 |
| W50   | IKCYDPGVTPKNIIDAFNGGISLVNYTGHGSETAWGTSHFGTTHVKQLTNSNQLPFIFDV   | 450 |
| W83   | IKCYDPGVTPKNIIDAFNGGISLVNYTGHGSETAWGTSHFGTTHVKQLTNSNQLPFIFDV   | 469 |
| 381   | ADHNTFGSVIPATGPLETGTASSDLNYSAN-FEYLIPANADPVVTTQNIIVTGOGEVVIPIG | 466 |
| . : * . : * * * : * : : * : : . . : : : * : : : |  |     |



|   |                                |  |                                 |               |         |     |
|---|--------------------------------|--|---------------------------------|---------------|---------|-----|
| W50   | ACVNGDFLFSMP                   | CFAEALMRAQKDG                              | -KPTGTVAIIASTINQSWASPMRGQ       | ---           | DEMNEIL | 525 |
| H66   | ACVNGDFLFSMP                   | CFAEALMRAQKDG                              | -KPTGTVAIIASTINQSWASPMRGQ       | ---           | DEMNEIL | 525 |
| 381   | ACVNGDFLFSMP                   | CFAEALMRAQKDG                              | -KPTGTVAIIASTINQSWASPMRGQ       | ---           | DEMNEIL | 525 |
| W50   | ACVNGDFLFSMP                   | CFAEALMRAQKDG                              | -KPTGTVAIIASTINQSWASPMRGQ       | ---           | DEMNEIL | 506 |
| W83   | ACVNGDFLFSMP                   | CFAEALMRAQKDG                              | -KPTGTVAIIASTINQSWASPMRGQ       | ---           | DEMNEIL | 525 |
| 381   | GVY--DYCITNPEPASGKM            | WIAGDGGNQPARYDDFTFEAGKKYTFTMR              | RAGMGD                          | GT            | DMEV    | 524 |
| . *: : * *: : * *: : : : *                  |                                |  |                                 |               |         |     |
| W50   | CEKHPNNIKRT                    | FGGVTMNGMFAMVEKYKKDG                       | -----EKMLDT-WTVFGDPSLLV         | RTL           | VL      | 577 |
| H66   | CEKHPNNIKRT                    | FGGVTMNGMFAMVEKYKKDG                       | -----EKMLDT-WTVFGDPSLLV         | RTL           | VL      | 577 |
| 381   | CEKHPNNIKRT                    | FGGVTMNGMFAMVEKYKKDG                       | -----EKMLDT-WTVFGDPSLLV         | RTL           | VL      | 57  |
| W50   | CEKHPNNIKRT                    | FGGVTMNGMFAMVEKYKKDG                       | -----EKMLDT-WTVFGDPSLLV         | RTL           | VL      | 558 |
| W83   | CEKHPNNIKRT                    | FGGVTMNGMFAMVEKYKKDG                       | -----EKMLDT-WTVFGDPSLLV         | RTL           | VL      | 577 |
| 381   | EDDSFASYTYTVYRDG               | TKIKEGLTETTYRDAGLSAQSH                     | EYCEVEVKYTAGVSPKVC              | VDYIP         |         | 584 |
| : . * . * . : . : . * . : * . : : * . : *   |                                |  |                                 |               |         |     |
| W50   | PTKMQVTAPAQINLT                | DASVNVSCDYN                                | GAIATISANGKMFGS                 | ----          | AVVENG  | 627 |
| H66   | PTKMQVTAPAQINLT                | DASVNVSCDYN                                | GAIATISANGKMFGS                 | ----          | AVVENG  | 627 |
| 381   | PTKMQVTAPAQINLT                | DASVNVSCDYN                                | GAIATISANGKMFGS                 | ----          | AVVENG  | 627 |
| W50   | PTKMQVTAPAQINLT                | DASVNVSCDYN                                | GAIATISANGKMFGS                 | ----          | AVVENG  | 608 |
| W83   | PTKMQVTAPAQINLT                | DASVNVSCDYN                                | GAIATISANGKMFGS                 | ----          | AVVENG  | 627 |
| 381   | DGVEDVTVQKPHTLT                | VVGKTTITVSWQGEAMIYDMNGRRLA                 | GRNTVVYTAQGGYYAV                | MMV           |         | 644 |
| : * . : * . : : : : * : : : : *             |                                |  |                                 |               |         |     |
| W50   | INLTGLTNESTLTLTVV              | GYNKETVIKTINTNGEPNPYQPVSNLTATTQ            | QKVTLKWDAPS                     |               |         | 687 |
| H66   | INLTGLTNESTLTLTVV              | GYNKETVIKTINTNGEPNPYQPVSNLTATTQ            | QKVTLKWDAPS                     |               |         | 687 |
| 381   | INLTGLTNESTLTLTVV              | GYNKETVIKTINTNGEPNPYQPVSNLTATTQ            | QKVTLKWDAPS                     |               |         | 687 |
| W50   | INLTGLTNESTLTLTVV              | GYNKETVIKTINTNGEPNPYQPVSNLTATTQ            | QKVTLKWDAPS                     |               |         | 668 |
| W83   | INLTGLTNESTLTLTVV              | GYNKETVIKTINTNGEPNPYQPVSNLTATTQ            | QKVTLKWDAPS                     |               |         | 687 |
| 381   | VDGKSYVEETRYQVNL               | SWTRRLCADTSKHSRVIVSEY                      | ESVARPPFKEVGR                   | ---           | LRFYAYY | 701 |
| : : . . : * : : : : * : : : : * : : : *     |                                |  |                                 |               |         |     |
| W50   | TKTNATTNTARSVDG                | IRELVLLSVSDAPE                             | LLRSGQAEIVLEAHDVVNDGSGYQILLDADH |               |         | 747 |
| H66   | TKTNATTNTARSVDG                | IRELVLLSVSDAPE                             | LLRSGQAEIVLEAHDVVNDGSGYQILLDADH |               |         | 747 |
| 381   | TKTNATTNTARSVDG                | IRELVLLSVSDAPE                             | LLRSGQAEIVLEAHDVVNDGSGYQILLDADH |               |         | 747 |
| W50   | TKTNATTNTARSVDG                | IRELVLLSVSDAPE                             | LLRSGQAEIVLEAHDVVNDGSGYQILLDADH |               |         | 728 |
| W83   | TKTNATTNTARSVDG                | IRELVLLSVSDAPE                             | LLRSGQAEIVLEAHDVVNDGSGYQILLDADH |               |         | 747 |
| 381   | SNILLKQFVPKSCMKRL              | SYLPHCKKGSFLRFRPSSTVITVCQFSWLEYLPVTQGVAGSS |                                 |               |         | 761 |
| : : . . : * : : : * . . . . * : : : : *     |                                |  |                                 |               |         |     |
| W50   | DQYGQVIPS                      | SDHTLWPNCSVPANLFAPFEY                      | TVPENADPSCSPTNMIMDGTASVNI       | PAGTY         |         | 807 |
| H66   | DQYGQVIPS                      | SDHTLWPNCSVPANLFAPFEY                      | TVPENADPSCSPTNMIMDGTASVNI       | PAGTY         |         | 807 |
| 381   | DQYGQVIPS                      | SDHTLWPNCSVPANLFAPFEY                      | TVPENADPSCSPTNMIMDGTASVNI       | PAGTY         |         | 807 |
| W50   | DQYGQVIPS                      | SDHTLWPNCSVPANLFAPFEY                      | TVPENADPSCSPTNMIMDGTASVNI       | PAGTY         |         | 788 |
| W83   | DQYGQVIPS                      | SDHTLWPNCSVPANLFAPFEY                      | TVPENADPSCSPTNMIMDGTASVNI       | PAGTY         |         | 807 |
| 381   | PVHTAKIRSCVEIVFRHSSIFVCYRSTGKY | NRMRLFNMLGKNFLRTKQKCLSLLRS                 | AW                              |               |         | 820 |
| : * * . . : : * : . : . : * . : : * : : : * |                                |  |                                 |               |         |     |
| W50   | DFAIAAPQANAKIWIAGQG            | PTKEDD-YVFEAGKKYHFLMKKMGSGDGT              | ELTISEGGGSDY                    |               |         | 866 |
| H66   | DFAIAAPQANAKIWIAGQG            | PTKEDD-YVFEAGKKYHFLMKKMGSGDGT              | ELTISEGGGSDY                    |               |         | 866 |
| 381   | DFAIAAPQANAKIWIAGQG            | PTKEDD-YVFEAGKKYHFLMKKMGSGDGT              | ELTISEGGGSDY                    |               |         | 866 |
| W50   | DFAIAAPQANAKIWIAGQG            | PTKEDD-YVFEAGKKYHFLMKKMGSGDGT              | ELTISEGGGSDY                    |               |         | 847 |
| W83   | DFAIAAPQANAKIWIAGQG            | PTKEDD-YVFEAGKKYHFLMKKMGSGDGT              | ELTISEGGGSDY                    |               |         | 866 |
| 381   | DIGIKLVLFQEGRYMES              | PGQSDERRTTIDFYGNGRYLLFRHS                  | ----                            | ELLVNGYQVKA   |         | 875 |
| * . * : : : : * : * : : : * : : : *         |                                |  |                                 |               |         |     |
| W50   | TYTVYRDG                       | TKIKEGLTATTFEEDGVATGNHEYC                  | VEVKYTAGVSPKVC                  | KDVTVEGSNEFAP |         | 926 |
| H66   | TYTVYRDG                       | TKIKEGLTATTFEEDGVATGNHEYC                  | VEVKYTAGVSPKVC                  | KDVTVEGSNEFAP |         | 874 |
| 381   | TYTVYRDG                       | TKIKEGLTATTFEEDGVATGNHEYC                  | VEVKYTAGVSPKVC                  | KDVTVEGSNEFAP |         | 926 |
| W50   | TYTVYRDG                       | TKIKEGLTATTFEEDGVATGNHEYC                  | VEVKYTAGVSPKVC                  | KDVTVEGSNEFAP |         | 907 |
| W83   | TYTVYRDG                       | TKIKEGLTATTFEEDGVATGNHEYC                  | VEVKYTAGVSPKVC                  | KDVTVEGSNEFAP |         | 926 |
| 381   | VVTMLG                         | TKPMGR                                     | -----                           |               |         | 887 |
| * *   |                                |  |                                 |               |         |     |



|     |                            |  |      |
|-----|----------------------------|--|------|
| W50 | VQNLTGSAVGQKVTCLKWDAPN--GT | PNPNPNPNPNPGTTTTLSESFENGIPASWKTIDADG   | 984  |
| H66 | -----                      | -----                                  | 874  |
| 381 | VQNLTGSAVGQKVTCLKWDAPNGT   | PNPNPNPNPNPNPGTTTTLSESFENGIPASWKTIDADG | 986  |
| W50 | VQNLTGSAVGQKVTCLKWDAPNGT   | PNPNPNPNPNPNPGTTTTLSESFENGIPASWKTIDADG | 967  |
| W83 | VQNLTGSAVGQKVTCLKWDAPNGT   | PNPNPNPNPNPNPGTTTTLSESFENGIPASWKTIDADG | 986  |
| 381 | -----                      | -----                                  | 887  |
| W50 | DGHGWKPGNAPGIAGYNSNGCVYSES | FGLGGIGVLTDPNYLITPALDLPNGGKLTFWVCA     | 1044 |
| H66 | -----                      | -----                                  | 874  |
| 381 | DGHGWKPGNAPGIAGYNSNGCVYSES | FGLGGIGVLTDPNYLITPALDLPNGGKLTFWVCA     | 1046 |
| W50 | DGHGWKPGNAPGIAGYNSNGCVYSES | FGLGGIGVLTDPNYLITPALDLPNGGKLTFWVCA     | 1027 |
| W83 | DGHGWKPGNAPGIAGYNSNGCVYSES | FGLGGIGVLTDPNYLITPALDLPNGGKLTFWVCA     | 1046 |
| 381 | -----                      | -----                                  | 887  |
| W50 | QDANYASEHYAVYASSTGNDA      | SFTNALLEETITAKGVRSP                    | 1104 |
| H66 | -----                      | -----                                  | 874  |
| 381 | QDANYASEHYAVYASSTGNDA      | SFTNALLEETITAKGVRSP                    | 1106 |
| W50 | QDANYASEHYAVYASSTGNDA      | SFTNALLEETITAKGVRSP                    | 1087 |
| W83 | QDANYASEHYAVYASSTGNDA      | SFTNALLEETITAKGVRSP                    | 1106 |
| 381 | -----                      | -----                                  | 887  |
| W50 | AGTKYVAFRHFQSTDMFYIDL      | DEVEIKANGKRADFTETFESSTHGEAP            | 1164 |
| H66 | -----                      | -----                                  | 874  |
| 381 | AGTKYVAFRHFQSTDMFYIDL      | DEVEIKANGKRADFTETFESSTHGEAT            | 1166 |
| W50 | AGTKYVAFRHFQSTDMFYIDL      | DEVEIKANGKRADFTETFESSTHGEAP            | 1147 |
| W83 | AGTKYVAFRHFQSTDMFYIDL      | DEVEIKANGKRADFTETFESSTHGEAP            | 1166 |
| 381 | -----                      | -----                                  | 887  |
| W50 | QGWLCLSSGQLDWLTAHGGTN      | VVASFSWNGMALNPDNYLISKDVTGATKV          | 1224 |
| H66 | -----                      | -----                                  | 874  |
| 381 | QGWLCLSSGQLDWLTAHGGTN      | VVASFSWNGMALNPDNYLISKDVTGATKV          | 1226 |
| W50 | QGWLCLSSGQLDWLTAHGGTN      | VVASFSWNGMALNPDNYLISKDVTGATKV          | 1207 |
| W83 | QGWLCLSSGQLDWLTAHGGTN      | VVASFSWNGMALNPDNYLISKDVTGATKV          | 1226 |
| 381 | -----                      | -----                                  | 887  |
| W50 | PGDHYAVMISKTGTNAGDFT       | VVFEETPNGINKGGARFGLSTEAN               | 1284 |
| H66 | -----                      | -----                                  | 874  |
| 381 | PGDHYAVMISKTGTNAGDFT       | VVFEETPNGINKGGARFGLSTEAD               | 1286 |
| W50 | PGDHYAVMISKTGTNAGDFT       | VVFEETPNGINKGGARFGLSTEAN               | 1267 |
| W83 | PGDHYAVMISKTGTNAGDFT       | VVFEETPNGINKGGARFGLSTEAD               | 1286 |
| 381 | -----                      | -----                                  | 887  |
| W50 | AGTKYVAFRHYNCSDLNYILL      | DDIQFTMGGSPTPTDYTYTVYRDG               | 1344 |
| H66 | -----                      | -----                                  | 874  |
| 381 | AGTKYVAFRHYNCSDLNYILL      | DDIQFTMGGSPTPTDYTYTVYRDG               | 1346 |
| W50 | AGTKYVAFRHYNCSDLNYILL      | DDIQFTMGGSPTPTDYTYTVYRDG               | 1327 |
| W83 | AGTKYVAFRHYNCSDLNYILL      | DDIQFTMGGSPTPTDYTYTVYRDG               | 1346 |
| 381 | -----                      | -----                                  | 887  |
| W50 | GVATGNHEYCV                | EVKYTAGVSPKECVNVTINPTQFN               | 1404 |
| H66 | -----                      | -----                                  | 874  |
| 381 | GVATGNHEYCV                | EVKYTAGVSPKKECVNVTINPTQFN              | 1406 |
| W50 | GVATGNHEYCV                | EVKYTAGVSPKECVNVTINPTQFN               | 1387 |
| W83 | GVATGNHEYCV                | EVKYTAGVSPKKECVNVTINPTQFN              | 1406 |
| 381 | -----                      | -----                                  | 887  |

|     |  |      |
|-----|--|------|
| W50 | TEGSREVKRIGDGLFVTIEPANDVRANEAKVVLAADNVWGDNTGYQFLLDADHNTFGSVI   | 1464 |
| H66 | -----  | 874  |
| 381 | TEGSREVKRIGDGLFVTIEPANDVRANEAKVVLAADNVWGDNTGYQFLLDADHNTFGSVI   | 1466 |
| W50 | TEGSREVKRIGDGLFVTIEPANDVRANEAKVVLAADNVWGDNTGYQFLLDADHNTFGSVI   | 1447 |
| W83 | TEGSREVKRIGDGLFVTIEPANDVRANEAKVVLAADNVWGDNTGYQFLLDADHNTFGSVI   | 1466 |
| 381 | -----  | 887  |
| W50 | PATGPLFTGTASSNLYSANFEYLIPANADPVVTTQNIIVTGQGEVVIPGGVYDYCITNPE   | 1524 |
| H66 | -----  | 874  |
| 381 | PATGPLFTGTASSDLYSANFEYLIPANADPVVTTQNIIVTGQGEVVIPGGVYDYCITNPE   | 1526 |
| W50 | PATGPLFTGTASSNLYSANFEYLIPANADPVVTTQNIIVTGQGEVVIPGGVYDYCITNPE   | 1507 |
| W83 | PATGPLFTGTASSDLYSANFESLIPANADPVVTTQNIIVTGQGEVVIPGGVYDYCITNPE   | 1526 |
| 381 | -----  | 887  |
| W50 | PASGKMWIAGDGGNQPARYDDFTFEAGKKYFTFMRRAGMGDGTDMEVEDDSPASYTYTVY   | 1584 |
| H66 | -----  | 874  |
| 381 | PASGKMWIAGDGGNQPARYDDFTFEAGKKYFTFMRRAGMGDGTDMEVEDDSPASYTYTVY   | 1586 |
| W50 | PASGKMWIAGDGGNQPARYDDFTFEAGKKYFTFMRRAGMGDGTDMEVEDDSPASYTYTVY   | 1567 |
| W83 | PASGKMWIAGDGGNQPARYDDFTFEAGKKYFTFMRRAGMGDGTDMEVEDDSPASYTYTVY   | 1586 |
| 381 | -----  | 887  |
| W50 | RDGTKIKEGLTETTYRDAGMSAQSHHEYCV EVKYAAGVSPKVCVDYIPDGVADVTAQKPYT | 1644 |
| H66 | ---TKIKEGLTETTYRDAGMSAQSHHEYCV EVKYAAGVSPKVCVDYIPDGVADVTAQKPYT | 931  |
| 381 | RDGTKIKEGLTETTYRDAGMSAQSHHEYCV EVKYTAGVSPKVCVDYIPDGVADVTAQKPYT | 1646 |
| W50 | RDGTKIKEGLTETTYRDAGMSAQSHHEYCV EVKYAAGVSPKVCVDYIPDGVADVTAQKPYT | 1627 |
| W83 | RDGTKIKEGLTETTYRDAGMSAQSHHEYCV EVKYTAGVSPKVCVDYIPDGVADVTAQKPYT | 1646 |
| 381 | --GHKVSPSMVKLYAQELGLPILQPDNLNEESFLDELRLQIVVAFRMLP              | 939  |
|     | * . . . . . * . . . . . * . . . . . * . . . . .                |      |
| W50 | LTVVGKTIITVTCQGEAMIYDMNGRRLAAGRNTVVYTAQGGYYAVMVVVDGKSYVEKLAVK  | 1704 |
| H66 | LTVVGKTIITVTCQGEAMIYDMNGRRLAAGRNTVVYTAQGGYYAVMVVVDGKSYVEKLAVK  | 991  |
| 381 | LTVVGKTIITVTCQGEAMIYDMNGRRLAAGRNTVVYTAQGGYYAVMVVVDGKSYVKKLAIK  | 1706 |
| W50 | LTVVGKTIITVTCQGEAMIYDMNGRRLAAGRNTVVYTAQGGYYAVMVVVDGKSYVEKLAVK  | 1687 |
| W83 | LTVVGKTIITVTCQGEAMIYDMNGRRLAAGRNTVVYTAQGGYYAVMVVVDGKSYVEKLAIK  | 1706 |
| 381 | RSVWQMPMPMGTINLHGSLLPMYR-----GAAPIQPRDTPWRYGKRELPPSASGMR-----  | 989  |
|     | : * . . . . . : . . . . . : . . . . . : . . . . .              |      |

Figura 1- Alinhamento obtido com o programa ClustalW2 das diferentes variantes da gingipain R1. Do lado esquerdo identifica-se a estirpe de *Porphyromonas gingivalis* e do lado direito mostra-se a numeração dos aminoácidos das variantes da gingipain R1. Os aminoácidos conservados em todas as variantes encontram-se salientados a cinzento-escuro e os aminoácidos considerados semelhantes a cinzento claro.



|            |   |     |
|------------|---|-----|
| W50        | MKKNFSRIVSIVAFSSLLGGMAFAQPAERGRNPQVRLLSAEQSMSKVQFRMDNLQFTD    | 60  |
| H66        | MKKNFSRIVSIVAFSSLLGGMAFAQPAERGRNPQVRLLSAEQSMSKVQFRMDNLQFTD    | 60  |
| ATCC 33277 | MKKNFSRIVSIVAFSSLLGGMAFAQPAERGRNPQVRLLSAEQSMSKVQFRMDNLQFTD    | 60  |
| W50        | TSKGVAQVPTFTTEGVNISEKGTPIPLILSRSLAVSETRAMKVEVVSSKFIEKKDVLIA   | 120 |
| H66        | TSKGVAQVPTFTTEGVNISEKGTPIPLILSRSLAVSETRAMKVEVVSSKFIEKKDVLIA   | 120 |
| ATCC 33277 | TSKGVAQVPTFTTEGVNISEKGTPIPLILSRSLAVSETRAMKVEVVSSKFIEKKDVLIA   | 120 |
| W50        | KGVISRAENPDQIPYVYGQSYNEDKFFPGEIATLSDPFILRDVRGQVVNFAPLQYNPVT   | 180 |
| H66        | KGVISRAENPDQIPYVYGQSYNEDKFFPGENATLSDPFILRDVRGQVVNFAPLQYNPVT   | 180 |
| ATCC 33277 | KGVISRAENPDQIPYVYGQSYNEDKFFPGEIATLSDPFILRDVRGQVVNFAPLQYNPVT   | 180 |
| W50        | TLRIYTEIVVAVSETAEAGQNTISLVKNSTFTGFEDIYKSVFMNYEATRYTPVEEKENG   | 240 |
| H66        | TLRIYTEIVVAVSETAEAGQNTISLVKNSTFTGFEDIYKSVFMNYEATRYTPVEEKENG   | 240 |
| ATCC 33277 | TLRIYTEIVVAVSETAEAGQNTISLVKNSTFTGFEDIYKSVFMNYEATRYTPVEEKENG   | 240 |
| W50        | MIVIVAKKYEEDIKDFVDWKNQRLRTEVKVAEDIASPVTANAIQQFVKQYEYEKEGNDL   | 300 |
| H66        | MIVIVAKKYEEDIKDFVDWKNQRLRTEVKVAEDIASPVTANAIQQFVKQYEYEKEGNDL   | 300 |
| ATCC 33277 | MIVIVAKKYEEDIKDFVDWKNQRLRTEVKVAEDIASPVTANAIQQFVKQYEYEKEGNDL   | 300 |
| W50        | YVLLVGDHKDIPAKITPGIKSDQVYGQIVGNDHYNEVFGRFSCSKEDLKTQIDRTHY     | 360 |
| H66        | YVLLVGDHKDIPAKITPGIKSDQVYGQIVGNDHYNEVFGRFSCSKEDLKTQIDRTHY     | 360 |
| ATCC 33277 | YVLLVGDHKDIPAKITPGIKSDQVYGQIVGNDHYNEVFGRFSCSKEDLKTQIDRTHY     | 360 |
| W50        | ERNITTEDKWLGGALCIASAEGGPSADNGESDIQHENVIANLLTQYGYTKIICKYDPGVT  | 420 |
| H66        | ERNITTEDKWLGGALCIASAEGGPSADNGESDIQHENVIANLLTQYGYTKIICKYDPGVT  | 420 |
| ATCC 33277 | ERNITTEDKWLGGALCIASAEGGPSADNGESDIQHENVIANLLTQYGYTKIICKYDPGVT  | 420 |
| W50        | PKNIIDAFNGGISLVNYTGHGSETAWGTSHFGTTHVKQLTNSNQLPFIIDVACVNGDFLE  | 480 |
| H66        | PKNIIDAFNGGISLVNYTGHGSETAWGTSHFGTTHVKQLTNSNQLPFIIDVACVNGDFLE  | 480 |
| ATCC 33277 | PKNIIDAFNGGISLVNYTGHGSETAWGTSHFGTTHVKQLTNSNQLPFIIDVACVNGDFLE  | 480 |
| W50        | SMPCFAEALMRAQKDGKPTGTVAIIASTINQSWASEPMRGQDEMNEILCEKHPNNIKRTFG | 540 |
| H66        | SMPCFAEALMRAQKDGKPTGTVAIIASTIDQYWAPPMRGQDEMNEILCEKHPNNIKRTFG  | 540 |
| ATCC 33277 | NVPCFAEALMRAQKDGKPTGTVAIIASTINQSWASEPMRGQDEMNEILCEKHPNNIKRTFG | 540 |
| W50        | GVTMNGMFAMVEKYKKDGEKMLDWTWTFGDPSSLVRTLVPTEMQVTAPANISASAQTFEV  | 600 |
| H66        | GVTMNGMFAMVEKYKKDGENMLDWTWTFGDPSSLVRTLVPTEMQVTAPANISASAQTFEV  | 600 |
| ATCC 33277 | GVTMNGMFAMVEKYKKDGEKMLDWTWTFGDPSSLVRTLVPTEMQVTAPANISASAQTFEV  | 600 |
| W50        | ACDYNGAIATLSDDGDMVGTAVKDGKAIKLNESIADETNLTLTVVGYNKVTVIKDVKV    | 660 |
| H66        | ACDYNGAIATLSDDGDMVGTAVKDGKAIKLNESIADETNLTLTVVGYNKVTVIKDVKV    | 660 |
| ATCC 33277 | ACDYNGAIATLSDDGDMVGTAVKDGKAIKLNESIADETNLTLTVVGYNKVTVIKDVKV    | 660 |
| W50        | EGTSIADVANDKPYTVAVSGKTIITVESPAAGLTIFDMNGRRVATAKNRMVFQAQNGVYAV | 720 |
| H66        | EGTSIADVANDKPYTVAVSGKTIITVESPAAGLTIFDMNGRRVATAKNRMVFQAQNGVYAV | 720 |
| ATCC 33277 | EGTSIADVANDKPYTVAVSGKTIITVESPAAGLTIFDMNGRRVATAKNRMVFQAQNGVYAV | 720 |
| W50        | RIATEGKTYTEKVIVK 736  |     |
| H66        | RIATEGKTYTEKVIVK 736  |     |
| ATCC 33277 | RIATEGKTYTEKVIVK 736  |     |

Figura 2- Alinhamento obtido com o programa **ClustalW2** das diferentes variantes da gingipain R2. Do lado esquerdo identifica-se a estirpe de *Porphyromonas gingivalis* e do lado direito mostra-se a numeração dos aminoácidos das variantes da gingipain R2. Os aminoácidos conservados em todas as variantes encontram-se salientados a cinzento-escuro e os aminoácidos considerados semelhantes a cinzento claro.

|            |                                 |   |                             |     |
|------------|---------------------------------|---|-----------------------------|-----|
| W12        | MRKLLLLIAASLLGVGLYAQ            | SAKIKLDAPTRTTCTNNSFKQFDASFSFNEVELTKVETK | 60                          |     |
| W83        | MRKLLLLIAASLLGVGLYAQ            | SAKIKLDAPTRTTCTNNSFKQFDASFSFNEVELTKVETK | 60                          |     |
| W50        | MRKLLLLIAASLLGVGLYAQ            | SAKIKLDAPTRTTCTNNSFKQFDASFSFNEVELTKVETK | 60                          |     |
| 381        | MRKLLLLIAASLLGVGLYAQ            | SAKIKLDAPTRTTCTNNSFKQFDASFSFNEVELTKVETK | 60                          |     |
| ATCC 33277 | MRKLLLLIAASLLGVGLYAQ            | SAKIKLDAPTRTTCTNNSFKQFDASFSFNEVELTKVETK | 60                          |     |
| H66        | MRKLLLLIAASLLGVGLYAQ            | NAKIKLDAPTRTTCTNNSFKQFDASFSFNEVELTKVETK | 60                          |     |
| *****      |                                 |   |                             |     |
| W12        | GGTFASVSIPGAFPTGEVGSPEVPAVRKLI  | AVPVGATPVVRVKSFTEQVYSLNQYGSEKL          | 120                         |     |
| W83        | GGTFASVSIPGAFPTGEVGSPEVPAVRKLI  | AVPVGATPVVRVKSFTEQVYSLNQYGSEKL          | 120                         |     |
| W50        | GGTFASVSIPGAFPTGEVGSPEVPAVRKLI  | AVPVGATPVVRVKSFTEQVYSLNQYGSEKL          | 120                         |     |
| 381        | GGTFASVSIPGAFPTGEVGSPEVPAVRKLI  | AVPVGATPVVRVKSFTEQVYSLNQYGSEKL          | 120                         |     |
| ATCC 33277 | GGTFASVSIPGAFPTGEVGSPEVPAVRKLI  | AVPVGATPVVRVKSFTEQVYSLNQYGSEKL          | 120                         |     |
| H66        | GGTFASVSIPGAFPTGEVGSPEVPAVRKLI  | AVPVGATPVVRVKSFTEQVYSLNQYGSEKL          | 120                         |     |
| *****      |                                 |   |                             |     |
| W12        | MPHQPSMSKSDDEKVPFVYNAAAYARKGFV  | QGELTQVEMLGTMRGVRIAALTINPVQYD           | 180                         |     |
| W83        | MPHQPSMSKSDDEKVPFVYNAAAYARKGFV  | QGELTQVEMLGTMRGVRIAALTINPVQYD           | 180                         |     |
| W50        | MPHQPSMSKSDDEKVPFVYNAAAYARKGFV  | QGELTQVEMLGTMRGVRIAALTINPVQYD           | 180                         |     |
| 381        | MPHQPSMSKSDDEKVPFVYNAAAYARKGFV  | QGELTQVEMLGTMRGVRIAALTINPVQYD           | 180                         |     |
| ATCC 33277 | MPHQPSMSKSDDEKVPFVYNAAAYARKGFV  | QGELTQVEMLGTMRGVRIAALTINPVQYD           | 180                         |     |
| H66        | MPHQPSMSKSDDEKVPFAYNAAAYARKGFV  | QGELTQVEMLGTMRGVRIAALTINPVQYD           | 180                         |     |
| *****      |                                 |   |                             |     |
| W12        | VVANQLKVRNNIEIEVSFQGADEVATQRLYD | ASFSPYFETAYKQLFNRDVYTDHGDLYNT           | 240                         |     |
| W83        | VVANQLKVRNNIEIEVSFQGADEVATQRLYD | ASFSPYFETAYKQLFNRDVYTDHGDLYNT           | 240                         |     |
| W50        | VVANQLKVRNNIEIEVSFQGADEVATQRLYD | ASFSPYFETAYKQLFNRDVYTDHGDLYNT           | 240                         |     |
| 381        | VVANQLKVRNNIEIEVSFQGADEVATQRLYD | ASFSPYFETAYKQLFNRDVYTDHGDLYNT           | 240                         |     |
| ATCC 33277 | VVANQLKVRNNIEIEVSFQGADEVATQRLYD | ASFSPYFETAYKQLFNRDVYTDHGDLYNT           | 240                         |     |
| H66        | VVANQLKVRNNIEIEVSFQGADEVATQRLYD | ASFSPYFETAYKQLFNRDVYTDHGDLYNT           | 240                         |     |
| *****      |                                 |   |                             |     |
| W12        | PVRMLVVAGAKFKEALKPWL            | TWKAQKGFYLDVHYTDEAEVGT                  | TNASIKAFIHKKYNDGLA          | 300 |
| W83        | PVRMLVVAGAKFKEALKPWL            | TWKAQKGFYLDVHYTDEAEVGT                  | TNASIKAFIHKKYNDGLA          | 300 |
| W50        | PVRMLVVAGAKFKEALKPWL            | TWKAQKGFYLDVHYTDEAEVGT                  | TNASIKAFIHKKYNDGLA          | 300 |
| 381        | PVRMLVVAGAKFKEALKPWL            | TWKAQKGFYLDVHYTDEAEVGT                  | TNASIKAFIHKKYNDGLA          | 300 |
| ATCC 33277 | PVRMLVVAGAKFKEALKPWL            | TWKAQKGFYLDVHYTDEAEVGT                  | TNASIKAFIHKKYNDGLA          | 300 |
| H66        | PVRMLVVAGAKFKEALKPWL            | TWKAQKGFYLDVHYTDEAEVGT                  | TNASIKAFIHKKYNDGLA          | 300 |
| *****      |                                 |   |                             |     |
| W12        | ASAAPVFLALVGDTDVISGEKGKTKKVTD   | LYSSAVDGDYFP                            | EMYTFRMSASSPEELTNI          | 360 |
| W83        | ASAAPVFLALVGDTDVISGEKGKTKKVTD   | LYSSAVDGDYFP                            | EMYTFRMSASSPEELTNI          | 360 |
| W50        | ASAAPVFLALVGDTDVISGEKGKTKKVTD   | LYSSAVDGDYFP                            | EMYTFRMSASSPEELTNI          | 360 |
| 381        | ASAAPVFLALVGDTDVISGEKGKTKKVTD   | LYSSAVDGDYFP                            | EMYTFRMSASSPEELTNI          | 360 |
| ATCC 33277 | ASAAPVFLALVGDTDVISGEKGKTKKVTD   | LYSSAVDGDYFP                            | EMYTFRMSASSPEELTNI          | 360 |
| H66        | ASAAPVFLALVGDTDVISGEKGKTKKVTD   | LYSSAVDGDYFP                            | EMYTFRMSASSPEELTNI          | 360 |
| *****      |                                 |   |                             |     |
| W12        | IDKVLMEYKATMPDKSYLEK            | VLLIAGADYSWNSQVGQPTIKYGM                | QYYYNQEHGYTDVYNY            | 420 |
| W83        | IDKVLMEYKATMPDKSYLEK            | VLLIAGADYSWNSQVGQPTIKYGM                | QYYYNQEHGYTDVYNY            | 420 |
| W50        | IDKVLMEYKATMPDKSYLEK            | VLLIAGADYSWNSQVGQPTIKYGM                | QYYYNQEHGYTDVYNY            | 420 |
| 381        | IDKY                            |   |                             | 364 |
| ATCC 33277 | IDKVLMEYKATMPDKSYLEK            | ALLIAGADSYWNP                           | KIGQQTIKYAVQYYYNQDHGYTDVYSY | 420 |
| H66        | IDKVLMEYKATMPDKSYLEK            | ALLIAGADSYWNP                           | KIGQQTIKYAVQYYYNQDHGYTDVYSY | 420 |
| ***        |                                 |   |                             |     |
| W12        | LKAPYTGCSYHLNTGV                | SFANYTAHGETAWADP                        | LLTTSQLKALTNKDKYFLAIGNCCITA | 480 |
| W83        | LKAPYTGCSYHLNTGV                | SFANYTAHGETAWADP                        | LLTTSQLKALTNKDKYFLAIGNCCITA | 480 |
| W50        | LKAPYTGCSYHLNTGV                | SFANYTAHGETAWADP                        | LLTTSQLKALTNKDKYFLAIGNCCITA | 480 |
| 381        |                                 |   |                             | 364 |
| ATCC 33277 | PKAPYTGCSYHLNTGV                | SFANYTAHGETSWADP                        | SLTATQVKALTNKDKYFLAIGNCCVTA | 480 |
| H66        | PKAPYTGCSYHLNTGV                | SFANYTAHGETSWADP                        | SVTATQVKALTNKNKYFLAIGNCCVTA | 480 |



|            |                    |                       |                        |            |     |
|------------|--------------------|-----------------------|------------------------|------------|-----|
| W12        | LKAPYTGCSYSHLNTGVS | FANYTAHGSETAWADPLLT   | TSQLKALTNKDKYFLAIGNCC  | ITA        | 480 |
| W83        | LKAPYTGCSYSHLNTGVS | FANYTAHGSETAWADPLLT   | TSQLKALTNKDKYFLAIGNCC  | ITA        | 480 |
| W50        | LKAPYTGCSYSHLNTGVS | FANYTAHGSETAWADPLLT   | TSQLKALTNKDKYFLAIGNCC  | ITA        | 480 |
| 381        |                    |                       |                        |            | 364 |
| ATCC 33277 | PKAPYTGCSYSHLNTGV  | G FANYTAHGSETSWADPSLT | TATQVKALTNKDKYFLAIGNCC | VTA        | 480 |
| H66        | PKAPYTGCSYSHLNTGV  | G FANYTAHGSETSWADPSVT | TATQVKALTNKNKYFLAIGNCC | VTA        | 480 |
| W12        | QFDYVQPCFGEVI      | TRVKEKGAYAYIGSSPNSY   | WGEDYYWSVGANAVFGVQPT   | FEGTSMGS   | 540 |
| W83        | QFDYVQPCFGEVI      | TRVKEKGAYAYIGSSPNSY   | WGEDYYWSVGANAVFGVQPT   | FEGTSMGS   | 540 |
| W50        | QFDYVQPCFGEVI      | TRVKEKGAYAYIGSSPNSY   | WGEDYYWSVGANAVFGVQPT   | FEGTSMGS   | 540 |
| 381        |                    |                       |                        |            | 364 |
| ATCC 33277 | QFDYPQPCFGEVM      | TRVKEKGAYAYIGSSPNSY   | WGEDYYWSVGANAVFGVQPT   | FEGTSMGS   | 540 |
| H66        | QFDYPQPCFGEVM      | TRVKEKGAYAYIGSSPNSY   | WGEDYYWSVGANAVFGVQPT   | FEGTSMGS   | 540 |
| W12        | YDATFLEDSYNTVNS    | IMWAGNLAATHAGNIGNI    | THIGAHYYWEAYHVLGDGS    | VMPYRAMP   | 600 |
| W83        | YDATFLEDSYNTVNS    | IMWAGNLAATHAGNIGNI    | THIGAHYYWEAYHVLGDGS    | VMPYRAMP   | 600 |
| W50        | YDATFLEDSYNTVNS    | IMWAGNLAATHAGNIGNI    | THIGAHYYWEAYHVLGDGS    | VMPYRAMP   | 600 |
| 381        |                    |                       |                        |            | 364 |
| ATCC 33277 | YDATFLEDSYNTVNS    | IMWAGNLAATHAGNIGNI    | THIGAHYYWEAYHVLGDGS    | VMPYRAMP   | 600 |
| H66        | YDATFLEDSYNTVNS    | IMWAGNLAATHAENIGNV    | THIGAHYYWEAYHVLGDGS    | VMPYRAMP   | 600 |
| W12        | KTNTYTLPASLPQNQAS  | YSIQASAGSYVAISKDGVLY  | GTGVANASGVATVSM        | TKQITENG   | 660 |
| W83        | KTNTYTLPASLPQNQAS  | YSIQASAGSYVAISKDGVLY  | GTGVANASGVATVSM        | TKQITENG   | 660 |
| W50        | KTNTYTLPASLPQNQAS  | YSIQASAGSYVAISKDGVLY  | GTGVANASGVATVSM        | TKQITENG   | 660 |
| 381        |                    |                       |                        |            | 364 |
| ATCC 33277 | KTNTYTLPASLPQNQAS  | YSIQASAGSYVAISKDGVLY  | GTGVANASGVATVNM        | TKQITENG   | 660 |
| H66        | KTNTYTLPASLPQNQAS  | YSIQASAGSYVAISKDGVLY  | GTGVANASGVATVNM        | TKQITENG   | 660 |
| W12        | NYDVVITRSNYLPVIKQ  | IQVGEPSPYQPVSNTATTQ   | GQKVTLKWEAPS           | AKKAEGSREV | 720 |
| W83        | NYDVVITRSNYLPVIKQ  | IQVGEPSPYQPVSNTATTQ   | GQKVTLKWEAPS           | AKKAEGSREV | 720 |
| W50        | NYDVVITRSNYLPVIKQ  | IQVGEPSPYQPVSNTATTQ   | GQKVTLKWEAPS           | AKKAEGSREV | 720 |
| 381        |                    |                       |                        |            | 364 |
| ATCC 33277 | NYDVVITRSNYLPVIKQ  | IQAAGEPSPYQPVSNTATTQ  | GQKVTLKWDAPS           | AKKAEASREV | 720 |
| H66        | NYDVVITRSNYLPVIKQ  | IQAAGEPSPYQPVSNTATTQ  | GQKVTLKWDAPS           | AKKAEASREV | 720 |
| W12        | RIGDGLFVTIEPANDVR  | ANEAKVVLAADNVWGDNTG   | YQFLLDADHNTFGSV        | IPATGPLEFT | 780 |
| W83        | RIGDGLFVTIEPANDVR  | ANEAKVVLAADNVWGDNTG   | YQFLLDADHNTFGSV        | IPATGPLEFT | 780 |
| W50        | RIGDGLFVTIEPANDVR  | ANEAKVVLAADNVWGDNTG   | YQFLLDADHNTFGSV        | IPATGPLEFT | 780 |
| 381        |                    |                       |                        |            | 364 |
| ATCC 33277 | RIGDGLFVTIEPANDVR  | ANEAKVVLAADNVWGDNTG   | YQFLLDADHNTFGSV        | IPATGPLEFT | 780 |
| H66        | RIGDGLFVTIEPANDVR  | ANEAKVVLAADNVWGDNTG   | YQFLLDADHNTFGSV        | IPATGPLEFT | 780 |
| W12        | GTASSNLYSANFEYL    | IPANADPVVTTQNIIVTGQ   | GEVVIPGGVYDYCITN       | PEPASGKMWI | 840 |
| W83        | GTASSNLYSANFEYL    | IPANADPVVTTQNIIVTGQ   | GEVVIPGGVYDYCITN       | PEPASGKMWI | 840 |
| W50        | GTASSNLYSANFEYL    | IPANADPVVTTQNIIVTGQ   | GEVVIPGGVYDYCITN       | PEPASGKMWI | 840 |
| 381        |                    |                       |                        |            | 364 |
| ATCC 33277 | GTASSNLYSANFEYL    | IPANADPVVTTQNIIVTGQ   | GEVVIPGGVYDYCITN       | PEPASGKMWI | 840 |
| H66        | GTASSNLYSANFEYL    | IPANADPVVTTQNIIVTGQ   | GEVVIPGGVYDYCITN       | PEPASGKMWI | 840 |
| W12        | AGDGGNQPARYDDFT    | FEAGKKYFTFTMRRAGMGD   | GTDMEVEDDSPASYTYT      | VYRDGTKIKE | 900 |
| W83        | AGDGGNQPARYDDFT    | FEAGKKYFTFTMRRAGMGD   | GTDMEVEDDSPASYTYT      | VYRDGTKIKE | 900 |
| W50        | AGDGGNQPARYDDFT    | FEAGKKYFTFTMRRAGMGD   | GTDMEVEDDSPASYTYT      | VYRDGTKIKE | 900 |
| 381        |                    |                       |                        |            | 364 |
| ATCC 33277 | AGDGGNQPARYDDFT    | FEAGKKYFTFTMRRAGMGD   | GTDMEVEDDSPASYTYT      | VYRDGTKIKE | 900 |
| H66        | AGDGGNQPARYDDFT    | FEAGKKYFTFTMRRAGMGD   | GTDMEVEDDSPASYTYT      | VYRDGTKIKE | 900 |

|            |   |      |
|------------|---|------|
| W12        | GLTATTTFEEDGVAAGNHEYCVVEVKYTAGVSPKVCKDVTVEGSNEFAPVQNLTGSSVGQKV  | 960  |
| W83        | GLTATTTFEEDGVAAGNHEYCVVEVKYTAGVSPKVCKDVTVEGSNEFAPVQNLTGSSVGQKV  | 960  |
| W50        | GLTATTTFEEDGVAAGNHEYCVVEVKYTAGVSPKVCKDVTVEGSNEFAPVQNLTGSSVGQKV  | 960  |
| 381        | -----   | 364  |
| ATCC 33277 | GLTATTTFEEDGVAAGNHEYCVVEVKYTAGVSPKVCKDVTVEGSNEFAPVQNLTGSAVGQKV  | 960  |
| H66        | GLTATTTFEEDGVAAGNHEYCVVEVKYTAGVSPKVCKDVTVEGSNEFAPVQNLTGSAVGQKV  | 960  |
| W12        | TLKWDAPNGTTPNPNPNPNPNPGTTLSESFENGIPASWKTIDADGDGHGWKPGNAPGIAGY   | 1020 |
| W83        | TLKWDAPNGTTPNPNPNPNPNPGTTLSESFENGIPASWKTIDADGDGHGWKPGNAPGIAGY   | 1020 |
| W50        | TLKWDAPNGTTPNPNPNPNPNPGTTLSESFENGIPASWKTIDADGDGHGWKPGNAPGIAGY   | 1020 |
| 381        | -----   | 364  |
| ATCC 33277 | TLKWDAPNGTTPNPNPNPNPNPG-TTTLSESFENGIPASWKTIDADGDGHGWKPGNAPGIAGY | 1019 |
| H66        | TLKWDAPNGTTPNPNPNPNPNPG-TTTLSESFENGIPASWKTIDADGDGHGWKPGNAPGIAGY | 1019 |
| W12        | NSNGCVYSESFGLGGIGVLTDPDNYLITPALDLPNGGKLTFWVCAQDANYASEHYAVYASS   | 1080 |
| W83        | NSNGCVYSESFGLGGIGVLTDPDNYLITPALDLPNGGKLTFWVCAQDANYASEHYAVYASS   | 1080 |
| W50        | NSNGCVYSESFGLGGIGVLTDPDNYLITPALDLPNGGKLTFWVCAQDANYASEHYAVYASS   | 1080 |
| 381        | -----   | 364  |
| ATCC 33277 | NSNGCVYSESFGLGGIGVLTDPDNYLITPALDLPNGGKLTFWVCAQDANYASEHYAVYASS   | 1079 |
| H66        | NSNGCVYSESFGLGGIGVLTDPDNYLITPALDLPNGGKLTFWVCAQDANYASEHYAVYASS   | 1079 |
| W12        | TGNDASNFTNALLEETITAKGVRSPKPAIRGRIQGTWRQKTVDLPAGTKYVAFRHFQSTDM   | 1140 |
| W83        | TGNDASNFTNALLEETITAKGVRSPKPAIRGRIQGTWRQKTVDLPAGTKYVAFRHFQSTDM   | 1140 |
| W50        | TGNDASNFTNALLEETITAKGVRSPKPAIRGRIQGTWRQKTVDLPAGTKYVAFRHFQSTDM   | 1140 |
| 381        | -----   | 364  |
| ATCC 33277 | TGNDASNFTNALLEETITAKGVRSPKPAIRGRIQGTWRQKTVDLPAGTKYVAFRHFQSTDM   | 1139 |
| H66        | TGNDASNFTNALLEETITAKGVRSPKPAIRGRIQGTWRQKTVDLPAGTKYVAFRHFQSTDM   | 1139 |
| W12        | FYIDLDEVEIKANGKRADFTTETFESSTHGEAPAEWTTIDADGDGQGWLCLSSGQLDWLTA   | 1200 |
| W83        | FYIDLDEVEIKANGKRADFTTETFESSTHGEAPAEWTTIDADGDGQGWLCLSSGQLDWLTA   | 1200 |
| W50        | FYIDLDEVEIKANGKRADFTTETFESSTHGEAPAEWTTIDADGDGQGWLCLSSGQLDWLTA   | 1200 |
| 381        | -----   | 364  |
| ATCC 33277 | FYIDLDEVEIKANGKRADFTTETFESSTHGEAPAEWTTIDADGDGQDWLCLSSGQLDWLTA   | 1199 |
| H66        | FYIDLDEVEIKANGKRADFTTETFESSTHGEAPAEWTTIDADGDGQGWLCLSSGQLDWLTA   | 1199 |
| W12        | HGGSNVVSSFSWNGMALNPDNYLISKDVTGATKVKKYYYAVNDGFPGDHYAVMISKTGTNA   | 1260 |
| W83        | HGGSNVVSSFSWNGMALNPDNYLISKDVTGATKVKKYYYAVNDGFPGDHYAVMISKTGTNA   | 1260 |
| W50        | HGGSNVVSSFSWNGMALNPDNYLISKDVTGATKVKKYYYAVNDGFPGDHYAVMISKTGTNA   | 1260 |
| 381        | -----   | 364  |
| ATCC 33277 | HGGTNVVASFSWNGMALNPDNYLISKDVTGATKVKKYYYAVNDGFPGDHYAVMISKTGTNA   | 1259 |
| H66        | HGGTNVVASFSWNGMALNPDNYLISKDVTGATKVKKYYYAVNDGFPGDHYAVMISKTGTNA   | 1259 |
| W12        | GDFTVVFEETPNGINKGGARFGLSTEANGAKPQSVWIERTVDLPAGTKYVAFRHYNCSDL    | 1320 |
| W83        | GDFTVVFEETPNGINKGGARFGLSTEANGAKPQSVWIERTVDLPAGTKYVAFRHYNCSDL    | 1320 |
| W50        | GDFTVVFEETPNGINKGGARFGLSTEANGAKPQSVWIERTVDLPAGTKYVAFRHYNCSDL    | 1320 |
| 381        | -----   | 364  |
| ATCC 33277 | GDFTVVFEETPNGINKGGARFGLSTEANGAKPQSVWIERTVDLPAGTKYVAFRHYNCSDL    | 1319 |
| H66        | GDFTVVFEETPNGINKGGARFGLSTEADGAKPQSVWIERTVDLPAGTKYVAFRHYNCSDL    | 1319 |
| W12        | NYILLDDIQFTMGGSPPTDYTYTVYRDGTKIKEGLTETTTFEEDGVATGNHEYCVVEVKYT   | 1380 |
| W83        | NYILLDDIQFTMGGSPPTDYTYTVYRDGNTIKEGLTETTTFEEYGVATGNHEYCVVEVKYT   | 1380 |
| W50        | NYILLDDIQFTMGGSPPTDYTYTVYRDGTKIKEGLTETTTFEEDGVATGNHEYCVVEVKYT   | 1380 |
| 381        | -----   | 364  |
| ATCC 33277 | NYILLDDIQFTMGGSPPTDYTYTVYRDGTKIKEGLTETTTFEEDGVATGNHEYCVVEVKYT   | 1379 |
| H66        | NYILLDDIQFTMGGSPPTDYTYTVYRDGTKIKEGLTETTTFEEDGVATGNHEYCVVEVKYT   | 1379 |



|                |  |      |
|----------------|--|------|
| W12            | AGVSPKKCVDTVNSTQFNFPVQNLTAEQAPNSMDAILKWNAPASKRAEVLNEDFE-NGIP   | 1439 |
| W83            | AGVSPKKCVDTVTVNSTQFNFPVQNLTAEQAPNSMDAILKWNAPASKRAEVLNEDFE-NGIP | 1439 |
| W50            | AGVSPKKCVNVTVNSTQFNFPVQNLTAEQAPNSMDAILKWNAPASKRAEVLNEDFE-NGIP  | 1439 |
| 381            | -----  | 364  |
| ATCC 33277 H66 | AGVSPKVCVNVTINPTQFNFPVKNLKAQ--PDGGDVVLKWEAFSGKRGEELLNEDFEGDAIP | 1437 |
|                | AGVSPKKCVNVTVNSTQFNFPVKNLKAQ--PDGGDVVLKWEAFSAKKAEGSREVKR--IGD  | 1435 |
|                |  |      |
| W12            | ASWKTIDADGDDGNWTTTTP---PPGG----SSFAGHNSAICVSSASHINFEGPQNPDNYL  | 1492 |
| W83            | ASWKTIDAHGDGNNWTTTTP---PPGG----SSFAGHNSAICVSSASHINFEGPQNPDNYL  | 1492 |
| W50            | ASWKTIDADGDDGNWTTTTP---PPGG----SSFAGHNSAICVSSASYINFEGPQNPDNYL  | 1492 |
| 381            | -----  | 364  |
| ATCC 33277 H66 | TGWTALDADGDDGNWDITLNEFTRGERHVLSPLRASNVAISYSSLQGQEYLPLTFNNFL    | 1497 |
|                | GLFVTIEPANDVRANEAKVVLAADN-----VWGDNITGYQFLLDADHNTFGSVIPATGP    | 1488 |
|                |  |      |
| W12            | VTELSLPGGGTTLTFWVCAQDA-NYASEHYAVYASSTGNDASNFANALLEEVLTAKTVVT   | 1551 |
| W83            | VTELSLPGGGTTLTFWVCAQDA-NYASEHYAVYASSTGNDASNFANALLEEVLTAKTVVT   | 1551 |
| W50            | VTELSLPGGGTTLTFWVCAQDA-NYASEHYAVYASSTGNDASNFANALLEEVLTAKTVVT   | 1551 |
| 381            | -----  | 364  |
| ATCC 33277 H66 | ITPKV--EGAKKITKYKGVSPLPQWSHDHYALCISKSGTAAADF-----EVIFEETMTY    | 1549 |
|                | LFTGTASSNLYSANFEYLIPANADPVVTTQNIIVTGQG--EVVIPGGVVDYCITNPEPAS   | 1546 |
|                |  |      |
| W12            | APEAIRGTRAQGTWYQKT VQLPAGTKY-VAFRHFGCTDFFWINLDDVVITS-GNAPSITY  | 1609 |
| W83            | APEAIRGTRAQGTWYQKT VQLPAGTKY-VAFRHFGCTDFFWINLDDVVITS-GNAPSITY  | 1609 |
| W50            | APEAIRGTRAQGTWYQKT VQLPAGTKY-VAFRHFGCTDFFWINLDDVVITS-GNAPSITY  | 1609 |
| 381            | -----  | 364  |
| ATCC 33277 H66 | TQGGANLTREK-----DLPAAGTKY-VAFRHYNCTDVLGIMIDDVVITGEGEGPSITY     | 1600 |
|                | GKMWIAGDGGNQPARYDDFTFEAGKKYTFTMRRAGMGDGTDEVED-----DSPASITY     | 1600 |
|                |  |      |
| W12            | TIYRNNTQIASGVTTETTYRDPDLATGFYTYGVKVVPNGESALETATLNITSLADVTAQK   | 1669 |
| W83            | TIYRNNTQIASGVTTETTYRDPDLATGFYTYGVKVVPNGESALETATLNITSLADVTAQK   | 1669 |
| W50            | TIYRNNTQIASGVTTETTYRDPDLATGFYTYGVKVVPNGESALETATLNITSLADVTAQK   | 1669 |
| 381            | -----  | 364  |
| ATCC 33277 H66 | TVYRDGTKIQEGLTETTYRDAGMSAQSHCYCEVEVKYAAGVSPKVCVDYIPDGVADVTAQK  | 1660 |
|                | TVYRDGTKIKEGLTETTYRDAGMSAQSHCYCEVEVKYAAGVSPKVCVDYIPDGVADVTAQK  | 1660 |
|                |  |      |
| W12            | PYTLTVVGKTTITVTCQGEAMIYDMNGRRRLAAGRNTVVYTAQGGHYAVMVVVDGKSYVEKL | 1729 |
| W83            | PYTLTVVGKTTITVTCQGEAMIYDMNGRRRLAAGRNTVVYTAQGGHYAVMVVVDGKSYVEKL | 1729 |
| W50            | PYTLTVVGKTTITVTCQGEAMIYDMNGRRRLAAGRNTVVYTAQGGHYAVMVVVDGKSYVEKL | 1729 |
| 381            | -----  | 364  |
| ATCC 33277 H66 | PYTLTVVGKTTITVTCQGEAMIYDMNGRRRLAAGRNTVVYTAQGGYYAVMVVVDGKSYVEKL | 1720 |
|                | PYTLTVVGKTTITVTCQGEAMIYDMNGRRRLAAGRNTVVYTAQGGYYAVMVVVDGKSYVEKL | 1720 |
|                |  |      |
| W12            | AVK  | 1732 |
| W83            | AVK  | 1732 |
| W50            | AVK  | 1732 |
| 381            | ---  | 364  |
| ATCC 33277 H66 | AIK  | 1723 |
|                | AVK  | 1723 |



## 2. Alinhamento periodontain, PrtT, streptopain, interpain

| Periodont | PrTt | Streptop | Interpain A |  |     |
|-----------|------|----------|-------------|--|-----|
| Periodont | PrTt | Streptop | Interpain A | MEKPSKCSFPIGYSFFKHIYMKIKQNLFFVAFVLLMLVPTFAWAKPRTEKQ-----M                        | 53  |
| Periodont | PrTt | Streptop | Interpain A | ALNLRARLALRQISLRMGQTAVSDKISIDYVYRQGD AERGITSQEEGSPAYFYVANRGNNE                   | 88  |
| Periodont | PrTt | Streptop | Interpain A | AEQTAKNFFAKRQPTLSSSTAS--LRMDFVYKAAEREE-----ALFFVFNRGEKD                          | 75  |
| Periodont | PrTt | Streptop | Interpain A | AKDSAITFIQKSAAIKAGARSAEDIKLDKVN LGGELSG-----SNMYVYNISTG-                         | 86  |
| Periodont | PrTt | Streptop | Interpain A | KKTAASAINLQTTLKGHKMNAPQQGGKRTVNQLRELKQ-----THTYTVFGYTDG                          | 103 |
| Periodont | PrTt | Streptop | Interpain A | GYALVAADDRIPTILAYSPIGRFDMDSMPDNLRMWLQIYDQEI GLILSGKAR--LNEEI                     | 145 |
| Periodont | PrTt | Streptop | Interpain A | GFLLVAADDRFEVIGYAFKGHFDAARM PDNLRGWLKGYEREMLA VMDGKAEPIDPIRE                     | 135 |
| Periodont | PrTt | Streptop | Interpain A | GFVIVSGDKRSEILIGYSTSGSFDANGK-ENIASFMESYVEQIKENKK-----L                           | 134 |
| Periodont | PrTt | Streptop | Interpain A | GFAVISADDLAPELLGVSESNFVETDNP--SFKWWLKAIDEVITNAVKNNKP-----L                       | 154 |
| Periodont | PrTt | Streptop | Interpain A | LRTEGVPAEVHALMDNGHFANDPMRWNGYVWNKE PLLP-----NGNHAYTGCVA                          | 196 |
| Periodont | PrTt | Streptop | Interpain A | KPTRDLPSIIAPILETGEHASDPI LWDQGYPFNTLH PLLP-----SGQQAYTGCVA                       | 186 |
| Periodont | PrTt | Streptop | Interpain A | DDTYAGTAEIKQPVVKSLLDSKGIHYNQGNPYNLLTPVIEKVKPGEQSFVQQAATGCVA                      | 194 |
| Periodont | PrTt | Streptop | Interpain A | SVIKPDPSKYAAEVSTLLTTT---WGQQMPY NKLLPNTK-----KGRLLITGCVA                         | 200 |
| Periodont | PrTt | Streptop | Interpain A | TAAAQIMRHYHSWFLQGEGSFDYHAGSLVGN-----WSGTFGEMYDWINMPGNPDLNL                       | 249 |
| Periodont | PrTt | Streptop | Interpain A | TAMGQIMRHYKWPEKASGEYDYDDMTGHT---HYSGTFGETYNWSKMPGNISVG-I                         | 240 |
| Periodont | PrTt | Streptop | Interpain A | TATAQIMKYHNYPNKGLKDYTYTLSSNNPYFNHPKNLFAAISTRQYNWNNILPTYSGR-E                     | 253 |
| Periodont | PrTt | Streptop | Interpain A | TATAQALNYFKYFVRGIGSHTVHYFANDPSG---VAISADFGNTTYDANMKDDYSGN-Y                      | 256 |
| Periodont | PrTt | Streptop | Interpain A | TQSQVDAYATLMDRDSVASVSMFY--ENGSGTYSVYVVGALRNNFRYKRSLQLHVRALYT                     | 307 |
| Periodont | PrTt | Streptop | Interpain A | SPEEVKALSTFMRDVSFSVNMQFA--DFGSGTFSIFVERALRET FHYKKSRLYIHRSLLP                    | 298 |
| Periodont | PrTt | Streptop | Interpain A | SNVQKMAISELMADVGISVDM DYG--PSSGSAGSSRVQRALKENFGYNQSVHQINRSDFS                    | 311 |
| Periodont | PrTt | Streptop | Interpain A | TEAEANAVATLMLHCGVASEMQYGGPNEGSGAYMTDCAAGLRTYFGFTD-AEYITRADYT                     | 315 |
| Periodont | PrTt | Streptop | Interpain A | SQEWHD MIRGELASGRPVVYYAGN----NQSIGHAFVC DGYASDGTFFHFNWGWGGVSNCF                  | 362 |
| Periodont | PrTt | Streptop | Interpain A | GKEWKDMIRKELAE NRPPVYYAGA----DGSMGHAFVC DGYEPDGTFFHFNWGWGGMSNGN                  | 353 |
| Periodont | PrTt | Streptop | Interpain A | KQDWEAQIDKELSQNPVYYQGV----GKVGGHAFVIDGADGRNFYHVNWGWGGVSDGF                       | 366 |
| Periodont | PrTt | Streptop | Interpain A | DEQWMDIVFSELTKGHPLIYGGVSPGSMGQDAGHAFVIDGYNKAGLVSVNWGWNGD VDSY                    | 375 |
| Periodont | PrTt | Streptop | Interpain A | YKLTLLSPTSLSGIGGEGIGFTIYQEITIGIEPAKTPAEAGTDALPILALKDIEAEYKSES                    | 422 |
| Periodont | PrTt | Streptop | Interpain A | FYLNLLNPGSLGTGAGDGGYSTQDEVVIGIEPASN-EAPGIVDPDTITLYGLQHN-MSDE                     | 411 |
| Periodont | PrTt | Streptop | Interpain A | FRLDALNPSALGTGGGAGGFNGYQSAVVGIKP-----FTAEQDMVRGVY GKPKDLEKRTINLT KAGMLAESIPADMRE | 398 |
| Periodont | PrTt | Streptop | Interpain A | YKIDLLNPGNMYS-----FTAEQDMVRGVY GKPKDLEKRTINLT KAGMLAESIPADMRE                    | 429 |
| Periodont | PrTt | Streptop | Interpain A | GLNVEYSIYNTGEEQSNLDDLGYRLNKADGEVIEVKTSSNNISWYGYG-EHPESFSLAPNQ                    | 481 |
| Periodont | PrTt | Streptop | Interpain A | ALDLSVKIKNYSTYAGDVKLAYRLTLFNGTETTNPAVTVPILVWEDIIGESTGNITIPCSQ                    | 471 |
| Periodont | PrTt | Streptop | Interpain A | KIGELTTLTG DINGSDFRVIREMAGCDYACKFTQGGLSMLDIKGARIVSGGEAYLKDGQLT                   | 398 |
| Periodont | PrTt | Streptop | Interpain A | LSQGISTITLLYRRTGTEQWEPVRHAQGGYVNSIKVNTTDPNNVVTVTDNNEGKLSIVPN                     | 541 |
| Periodont | PrTt | Streptop | Interpain A | FAEGKNTISILYRTDGMADWKELKHILMGLVNKIEVTMPAGD---VAYSVADARIVLKDG                     | 528 |
| Periodont | PrTt | Streptop | Interpain A | TTNDNLPERVFFYGCNSLRKIVLPDGLKTI SDGT FALCRALEAVDNI PAGGGDNFVYENGI                 | 398 |
| Periodont | PrTt | Streptop | Interpain A | SFVADLNSYEHSTITVQFNSDSPDEIRTPVAFALSTGATADDVISLGWVMAEVPGGSSN-                     | 549 |
| Periodont | PrTt | Streptop | Interpain A | SLSHNLKAYS DCKLSATVYNPGTEEFRSRVTFALRN--TEGRLYFLGRHLVELHPGDEDG                    | 600 |
| Periodont | PrTt | Streptop | Interpain A | FYTKDRKEIISVVPSSAKGDLVVAEGITT LRNYALAGCIGIKRLVLP-----TTI                         | 586 |
| Periodont | PrTt | Streptop | Interpain A | YPVWVSKDVLTLSEG DYT LWYR--FSINNQKDEWKKIGSVSVKTPTEYTHPLFEVGHNQ T                  | 398 |
| Periodont | PrTt | Streptop | Interpain A | EKVSLTITIGL KARAGQYMLVCTGDMELLMEDASWIELASIEVAEHTSTHSSLLVASNPQI                   | 658 |
| Periodont | PrTt | Streptop | Interpain A | TNLGNESMAGCHSLAEIKIFAKQPPKV GKDP LLSRINSIILRPIDTKKTYRGWAGIPY                     | 646 |



|             |  |     |              |
|-------------|--|-----|--------------|
| Periodont   | STYTLDMAHNRVLPDFTLKNLGLPFNGELVVVFRQTQSSSGSLWAAQETVHIKQGETFVY | 718 |              |
| PrtT        | DLLTVHRANPETLPTFSITNEGGATFSGKIEIVAIKAFSETFFQAKEEHMSLAQGETKVL | 706 |              |
| Streptop    | -----  | 398 |              |
| Interpain A | RNIKEFGSIVTVRNTVRAYGEANPKFGYSVRGEYFEGKPEITCEANEKSPVGKYDIRIDY | 718 |              |
| Periodont   | KPVVEG-----SIPDGSYRATLHAFVNGQPQLYLKGKRNYYTVKIVNGTAVEAIE--    | 767 |              |
| PrtT        | SPELTANSSLYTNAELFPDGIYYIVIREQGFWDP-IDLFGDYYYRIRLITDLSSSXIAGK | 765 |              |
| Streptop    | -----  | 398 |              |
| Interpain A | GTITDKSIQLVGGVLTVDKATLTVSTDNVTRQEGKPNPEFVLHYRGFTNGENDQVLTVRP | 778 |              |
| Periodont   | SSEEIRVFPNPARDYVEISAPCIPQETSIILFDLSGKIVMKNLSLSAG-----HGR     | 817 |              |
| PrtT        | DVSTIVLYPNPAHDYVHVAIPPTYAGSTLRLFDIQGRMQLSTKIRICRYASRRRTSSEGH | 825 |              |
| Streptop    | -----  | 398 |              |
| Interpain A | TASTTATETSPAGEYDIIISGGEAQN--YKFSYKKGKLTVLTAAGIDHADASDAATPQTV | 836 |              |
| Periodont   | MDVSRLPNG-----AYILKVDGYTTKINIVH-----                         | 843 |              |
| PrtT        | LYRCGRRHGREALYSLIQSVNSKTDKGNAGWEIPSGHCPCTVC                  | 868 | PRTT_PORGI   |
| Streptop    | -----  | 398 | SPEB_STRPY   |
| Interpain A | YSVSGAKVGTASLSSLPRGVYIVNNKKVVVK-----                         | 868 | A9J7N5_PREIN |

Figura 4- Alinhamento obtido com o programa **ClustalW2** das diferentes variantes da periodontain, PrtT, streptopain e interpain A. Do lado esquerdo identifica-se a protease e do lado direito a numeração dos aminoácidos. Os aminoácidos conservados encontram-se salientados a cinzento-escuro e os aminoácidos considerados semelhantes a cinzento claro.

## Anexo II – Domínios funcionais das 3 gingipains

Tabela I- Resultados da identificação dos vários domínios da gingipain R1. O código que acompanha a designação de cada domínio identifica os domínios na base de dados InterPro.

|   | DOMÍNIOS FUNCIONAIS                    |  |   |                                    |  |
|---|--|--|---|------------------------------------|--|
|   | Significativos                         |  |   |                                    | Prováveis  |
| <b><u>Gingipain</u></b><br><b><u>R1</u></b><br><b><u>(P28784)</u></b> | Pro-peptido, peptidase C25 (IPR012600) | Peptidase C25, gingipain (IPR001769) (IPR005536) | Peptidase C25, C-terminal, região Ig-like (IPR005536) | Adesina (IPR011628)                | PKD (IPR000601); Peptidase C25, gingipain K (IPR018832); Região Ig-like, group 1, (IPR003344); |
|   | Resíduos 24-227                        | Resíduos 228-576                                 | Resíduos 578-657                                      | Resíduos 718-761, 782-822, 947-986 | Molécula de adesão intercelular/ vascular, N-terminal (IPR003987); VPS10 (IPR006581)           |

Tabela II- Resultados da identificação dos vários domínios da gingipain R2. O código que acompanha a designação de cada domínio identifica os domínios na base de dados InterPro.

|   | DOMÍNIOS FUNCIONAIS                    |                                      |   |                           |           |
|---|--|--------------------------------------|---|---------------------------|-----------|
|   | Significativos                         |                                      |   |                           | Prováveis |
| <b><u>Gingipain</u></b><br><b><u>R2</u></b><br><b><u>(P95493)</u></b> | Pro-peptido, peptidase C25 (IPR012600) | Peptidase C25, gingipain (IPR001769) | Peptidase C25, C-terminal, região Ig-like (IPR005536) | Adesina (IPR011628)       |           |
|   | Resíduos 25-229                        | Resíduos 230-578                     | Resíduos 580-660                                      | Resíduos 667-690, 692-731 |           |

Tabela III- Resultados da identificação dos vários domínios da gingipain K. O código que acompanha a designação de cada domínio identifica os domínios na base de dados InterPro.

|  | DOMÍNIOS FUNCIONAIS                          |   |   |  |   |
|--|--|---|---|--|---|
|  | Significativos                               |   |   |  | Prováveis   |
| <b><u>Gingipain</u></b><br><b><u>K</u></b><br><b><u>(O52050)</u></b> | Pro-peptido,<br>peptidase C25<br>(IPR012600) | Peptidase<br>C25,<br>gingipain<br>(IPR001769) | Peptidase<br>C25, C-<br>terminal,<br>região<br>Ig-like<br>(IPR005536) | Adesina<br>(IPR011628)                           | Factor de crescimento<br>(IPR002348);<br>Fibronectina, tipo III<br>(IPR003961); Inibidor<br>tecidual de MMP's, I 35<br>(IPR001820); Região Ig-<br>like, grupo 2<br>(IPR003343); Região Ig-<br>like, grupo 1<br>(IPR003344); Peptidase<br>C25, gingipain K<br>(IPR018832); Proteína<br>de <i>Plasmodium</i><br><i>circumsporozoite</i><br>(IPR003067); Molécula<br>de adesão intercelular/<br>vascular, N-terminal<br>(IPR003987); |
|  | Resíduos<br>476-498,<br>1639-1690            | Resíduos<br>366-685                           | Resíduos<br>1322-1395,<br>1592-1732                                   | Resíduos<br>982-1150,<br>1159-1330,<br>1591-1732 |   |